

MARIA LUCIA ALVES PEDROSO

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE LECTINA LIGANTE
DE MANOSE COM HEPATITE C CRÔNICA: RELAÇÃO COM GRAU DE FIBROSE
HEPÁTICA E RESPOSTA AO TRATAMENTO**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Medicina Interna, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Medicina Interna.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara de Messias Reason
Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edna Strauss**

CURITIBA

2007

A Pedro, André e Dora

AGRADECIMENTOS

Ao fazer meus agradecimentos, entendo oportuno expor o histórico que envolveu a realização desta tese e assim destacar o papel de tantos colegas no auxílio para que este estudo fosse realizado.

Em 1989 o vírus da hepatite C foi isolado. Ao final desse mesmo ano, tive o privilégio, graças ao Prof. Dr. Reginaldo Lopes e à Prof.^a Dr.^a Edna Strauss, de poder estudar, ao longo de dois anos, os primeiros testes diagnósticos desta infecção sob a orientação do Prof. Dr. Christian Treppe em Lyon, na França. Nessa ocasião trabalhei especificamente com os recém-criados testes sorológicos para detecção dos anticorpos do vírus C. Conhecí de perto as limitações e dificuldades dos primeiros testes laboratoriais para hepatite C, que foram paulatinamente substituídos por outros mais sensíveis e específicos. Naquele período foi iniciado pela primeira vez, naquele serviço, um novo método para detecção do vírus C (VHC) recém-desenvolvido nos Estados Unidos, denominado reação em cadeia da polimerase. Pude avaliar a importância para o médico clínico do conhecimento mais aprofundado das técnicas laboratoriais para sua posterior interpretação.

Esse trabalho foi objeto da minha dissertação de mestrado sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Edna Strauss.

Desde então me dedico bastante ao acompanhamento de pacientes portadores do VHC. O diagnóstico da doença já não é mais problema. Mas persistem dificuldades no combate a este vírus, o que fica bem evidenciado com a constatação no dia-a-dia do expressivo número de casos que não respondem ao tratamento e que evoluem para formas mais severas da doença. Sabe-se que estas dificuldades devem-se em grande parte ao pouco conhecimento da fisiopatologia da doença.

Em 2003, graças à Prof.^a Dr.^a Iara de Messias Reason, tive novamente o privilégio de poder estudar um outro tema relevante relacionado à infecção pelo o vírus C, ou seja, imunopatogenia da hepatite C.

Não podia imaginar quão árduo seria este trabalho devido, em especial, às dificuldades em nosso meio, para a realização dos exames laboratoriais mais complexos. Durante cerca de dois anos insistimos em fazer nós mesmos a genotipagem da proteína lectina ligante de manose (MBL) nos pacientes com hepatite C. Nesse período contamos com o apoio do Prof. Dr. Lineu Werneck e

da bioquímica Aline Freund, além da imensa colaboração da bioquímica Claudia Zen e dos funcionários do laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas. Somente o constante incentivo da Prof.^a Dr.^a Iara de Messias Reason não nos fez desistir e foi graças à professora que conseguimos a colaboração do Dr. Rudi Steffensen e do Dr. Jens Chistian Jensenius, dos centros que mais estudam no mundo a MBL, para a realização dos testes laboratoriais de que necessitávamos.

Ao longo destes anos, a Prof.^a Dr.^a Iara de Messias Reason, com o seu espírito batalhador e visionário, não só manteve a orientação desta tese e de outros colegas, mas também realizou pós-doutorado na Alemanha, onde fez estudos relevantes e aperfeiçoou-se na área de biologia molecular. Atualmente, conseguiu desenvolver um laboratório de biologia molecular no serviço que chefia, já com condições de realizar a genotipagem da MBL, o que facilitará enormemente estudos futuros. Quero expressar minha admiração pelo trabalho da Prof.^a Dr.^a Iara de Messias Reason e registrar um agradecimento muito especial a ela, sem a qual esta tese não teria sido realizada.

No período de elaboração da tese, conheci e aprendi bastante com a equipe de colegas pós-graduandos, orientados também pela Prof.^a Dr.^a Iara de Messias Reason e com a mesma linha de pesquisa sobre a MBL. A Prof.^a Dr.^a Iara de Messias Reason apresentou-me também suas colaboradoras, hoje muitas queridas e caras para mim, Dr.^a Lílian Ferrari e Dr.^a Angélica Boldt, que muito me ensinaram sobre MBL e me auxiliaram na elaboração desta tese; serei eternamente grata a elas.

Outras etapas para concretização deste trabalho também foram muito importantes e felizmente ocorreram com maior facilidade graças à colaboração de muitos. Chamou-me atenção a pronta e ampla disposição dos pacientes com hepatite C em querer colaborar com o estudo. Da mesma forma os doadores de sangue e funcionários dos Bancos de Sangue, que se dispuseram a auxiliar com o trabalho.

No período de análise da histologia hepática dos pacientes com Hepatite C, a contribuição do Prof. Dr. Sergio Ioshii e da Dr.^a Daniele Sakamoto na avaliação dos casos foi fundamental. A funcionária Eliane Maria de Siqueira também se destacou na seleção do material pela sua grande disposição e boa vontade em ajudar.

Em todo período de elaboração desta tese contei com o importante apoio e incentivo dos meus chefes do Serviço de Gastroenterologia, Prof. Dr. Julio César Pisani e Prof.^a Heda Amarante.

Tive também a satisfação de contar com o enorme apoio e incentivo da bioquímica Sueli Nakatani, quer seja na preocupação e iniciativa de enviar-me textos científicos relacionados ao estudo, quer seja na sua grande disposição e paciência para ensinar-me as técnicas de Biologia Molecular.

No auxílio à avaliação estatística dos dados deste estudo foi indispensável à participação e dedicação de Ângela Matta, na revisão ortográfica e de formatação final de Antônia Schwinden e Leia Rachel Castellar.

Ainda, poder contar com a experiência, a ponderação e o grande apoio da Prof.^a Dr.^a Edna Strauss foi indispensável.

E a família, foi o meu prumo. A influência dos meus avós Sebastião e Iracema Bello, meus pais e minha irmã, Alcinda, Luiz Renato e Rosa Maria Pedroso, na minha formação, incentivo para os estudos e ao que sou, certamente está refletida neste tabalho. Meu marido ao longo deste período demonstrou o grande companheiro que é, o seu apoio, respeito, incentivo e auxílio nos diferentes momentos deste estudo me levaram a admirá-lo e amá-lo ainda mais. Meus filhos foram surpreendentes, pois demonstraram a paciência que não é peculiar às crianças e muito incentivo à realização deste trabalho.

Quero expressar a todos aqui citados e também àqueles que porventura tenha infelizmente esquecido de nominar, o meu grande reconhecimento, enorme afeto e imensurável muito obrigado!

*...para lançar-se em tal empreendimento e vencer,
foi necessário uma vontade de ferro e uma
perseverança incansável.*

*Sim, mas esquece o principal. Depois de um curto
silêncio, levantando o dedo com ênfase:*

*A fé em Deus, sem esta fé, nossas forças não
teriam sido suficientes.*

(Extraído de um romance de William Somerset Maugham)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O VÍRUS DA HEPATITE C (VHC).....	4
3.1.1 Estrutura Viral	4
3.1.2 Patogênese da Infecção Viral.....	6
3.1.3 Epidemiologia	8
3.1.3.1 Transmissão e fatores de risco.....	9
3.1.4 História Natural	10
3.1.5 Diagnóstico	13
3.1.6 Tratamento	14
3.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL).....	17
3.2.1 Sistema Complemento	18
3.2.2 Histórico.....	22
3.2.3 Função da MBL	23
3.2.4 Estrutura Protéica da MBL.....	25
3.2.5 Estrutura Genética da MBL	27
3.2.6 Polimorfismo da MBL e suas Conseqüências Biológicas.....	27
3.2.7 Relevância Clínica das Variantes Genéticas da MBL	30
3.3 MBL EM PACIENTES COM VHC	31

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
4.1 CASUÍSTICA.....	35
4.1.1 Características Gerais dos Pacientes.....	35
4.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	36
4.1.3 Tratamento dos Pacientes com VHC com Interferon alfa (IFN α) ou Interferon alfa Peguilado (IFN α peg) e Ribavirina (RBV).....	37
4.1.4 Características Gerais do Grupo Controle.....	38
4.2 MÉTODOS	39
4.2.1 Pesquisa de anticorpos anti-VHB, anti-HIV, anti-VHC, RNA do VHC e genotipagem do VHC	39
4.2.2 Avaliação da concentração de MBL	40
4.2.3 Genotipagem dos polimorfismos <i>MBL2</i>	42
4.2.4 Análise Histopatológica	47
4.2.5 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS	49
5.1 HAPLÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM HEPATITE C E CONTROLES	49
5.2 GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM VHC E CONTROLES	49
5.3 GENÓTIPOS <i>MBL2</i> E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES COM HEPATITE C E CONTROLES	50
5.4 ANÁLISE DA FIBROSE HEPÁTICA NOS PACIENTES	54
5.4.1 Genótipos <i>MBL2</i> e Grau de Fibrose Hepática nos Pacientes	54
5.5 RELAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS <i>MBL2</i> E GENÓTIPOS DO VHC EM PACIENTES COM VHC	56
5.6 RESULTADOS DO TRATAMENTO COM IFN α E RBV EM PACIENTES COM HEPATITE C	57
5.6.1 Relação entre Genótipos <i>MBL2</i> e Resposta ao Tratamento com IFN α e RBV em Pacientes com VHC	58
5.7 RESULTADOS DO TRATAMENTO COM IFN α peg. E RBV EM PACIENTES COM VHC E ANÁLISE DOS FATORES RELACIONADOS À RESPOSTA FAVORÁVEL AO TRATAMENTO	58
5.7.1 Relação entre Genótipos <i>MBL2</i> e Resposta ao Tratamento com IFN α peg. e RBV em Pacientes com VHC	59

6	DISCUSSÃO	61
6.1	HAPLÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES E CONTROLES.....	61
6.2	GENÓTIPOS <i>MBL2</i> E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES E CONTROLES.....	63
6.3	GENÓTIPOS <i>MBL2</i> , FIBROSE HEPÁTICA E CONCENTRAÇÃO DE MBL EM PACIENTES COM VHC	67
6.4	RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN α OU IFN α peg. E RBV EM PACIENTES COM HEPATITE C	69
6.5	RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS <i>MBL2</i> E RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN α OU IFN α peg. E RBV EM PACIENTES COM VHC	70
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE 1 - ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS <i>MBL2</i>	89
	APÊNDICE 2 - EQUILÍBRIO HARDY-WEINBERG	90
	APÊNDICE 3 - PLANILHA COM RESULTADOS DOS PACIENTES	91
	APÊNDICE 4 - PLANILHA COM RESULTADOS DOS CONTROLES	95
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS.....	100
	ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE.....	102

LISTA DE TABELAS

1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS GRUPOS EM ESTUDO	35
2	HAPLÓTIPOS DE <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM VHC E CONTROLES	50
3	GENÓTIPOS DE <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM VHC E CONTROLES	50
4	GENÓTIPOS <i>MBL2</i> E CONCENTRAÇÃO DE MBL EM PACIENTES COM VHC E CONTROLES	51
5	CONCENTRAÇÃO DE MBL NOS GRUPOS DE ESTUDO	51
6	GENÓTIPOS DE <i>MBL2</i> E GRAVIDADE DA FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATITE C	55
7	RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS <i>MBL2</i> E GENÓTIPOS DO VHC	57
8	RELAÇÃO DO GENÓTIPO <i>MBL2</i> EM RELAÇÃO À RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN α E RBV	58
9	FATORES DE RISCO FAVORÁVEIS A RS AO TRATAMENTO DA HEPATITE C COM IFN α OU IFN α peg. E RBV	59
10	GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM RELAÇÃO A RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN α peg. E RBV EM PACIENTE COM VHC	60

LISTA DE QUADROS

1	INICIADORES DO EXON1 E REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MBL2</i>	42
2	SONDAS FLUORESCENTES, SONDAS DE ANCORAGEM E TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO DO EXON1 E REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MBL2</i>	43

LISTA DE FIGURAS

1	ESTRUTURA GENÉTICA DO VÍRUS C	5
2	PROCESSOS MOLECULARES QUE SINALIZAM A RESPOSTA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO PELO VHC	7
3	HISTÓRIA NATURAL DA HEPATITE C	11
4	VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO	19
5	FUNÇÕES DA MBL	24
6	ESTRUTURA DO GENE <i>MBL2</i>	25
7	TETRÂMERO DE SUBUNIDADE ESTRUTURAL DE MBL HUMANA	26
8	FLUXOGRAMA DO TRATAMENTO REALIZADO NOS PACIENTES COM HEPATITE C COM IFN α peg. E RBV	38
9	POSIÇÕES DOS INICIADORES E DAS SONDAS DE HIBRIDAÇÃO PARA A AMPLI- FICAÇÃO E GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO DO EXON 1	43
10	TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO DO EXON 1	44
11	CURVA DE DISSOCIAÇÃO DAS VARIANTES H/L	45
12	CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DAS VARIANTES P/Q E X/Y	47
13	GENÓTIPOS DE <i>MBL2</i> EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL NOS PACIENTES COM HEPATITE C	52
14	GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE MBL NO GRUPO CONTROLE	53
15	GENÓTIPOS DE <i>MBL2</i> EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE MBL NOS GRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES	53
16	GRAUS DE FIBROSE HEPÁTICA NOS PACIENTES COM HEPATITE C	54
17	RELAÇÃO ENTRE OS GRAUS DE FIBROSE HEPÁTICA E OS GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM HEPATITE C	55
18	RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS <i>MBL2</i> AGRUPADOS DE ACORDO COM A INFLUÊNCIA EXERCIDA SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL, E O GRAU DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM VHC	56
19	DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE GENÓTIPOS ENCONTRADOS NOS PACIENTES COM HEPATITE C	56
20	FLUXOGRAMA DO TRATAMENTO REALIZADO NOS PACIENTES COM HEPATITE C COM IFN α peg. OU RBV	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A, T, C, G	- adenina, timina, citosina e guanina
ALT	- Alanina amino transferase
ARG	- Argenina
ASP	- Aspartato
AST	- Aspartato amino transferase
CAH	- Hepatite crônica ativa
CD4	- Conjunto de diferenciação 4
CD8	- Conjunto de diferenciação 8
CI	- Intervalo de confiança
CR1	- Receptores do complemento 1
CR3	- Receptores do complemento 3
CRD	- Domínio de reconhecimento de carboidratos
CYS	- Cisteína
DO	- Densidade óptica
DNA	- Ácido desoxido ribonucleico
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetracético
EIA	- Imunoensaio enzimático
FRET	- Transferência de energia por ressonância fluorescente
GLU	- Glutamato
GLY	- Glicina
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HAART	- Terapia antiretroviral altamente ativa
Anti-HBc	- Anticorpo contra proteína c (core) do vírus da hepatite B
HCI	- Hepatite crônica inativa
HCC	- Hepatocarcinoma
HIV	- Vírus da imunodeficiência adquirida
HLA	- Antígenos leucocitários humanos
HNANB	- Hepatite não-A não-B
HRP	- Peroxidase do rábano silvestre
HVR1	- Região hipervariável 1 do envelope
IFN α	- Interferon alfa
IFN α peg.	- Interferon alfa/peguilado
IFN β	- Interferon beta
IRF-3	- Fator regulatório do Interferon -3
IRF-7	- Fator regulatório do Interferon -7
ISG	- Gene estimulado por interferon
ISGF3	- Gene estimulado por interferon fator 3

ISRE	- Elemento regulador pelo estímulo do interferon
LACEN	- Laboratório Central do Estado
LC	- Cirrose hepática
LIPA	- <i>Line Probe Assay</i>
MEIA	- Ensaio imunoenzimático usando micropartículas
MASP1	- Lectina ligante de manose associada a serina protease ¹
MASPs	- Lectina ligante de manose associada a serina proteases
MBL	- Lectina ligante de manose
MHC classe II	- Complexo de histocompatibilidade humana II
NCR	- Regiões não-codificantes
-NH ₂	- Radical amina
NK	- Células matadoras naturais
NR	- Não resposta
-OH	- Radical hidroxila
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OR	- Razão de possibilidades
ORF	- Fase aberta de leitura
p	- Significância
PAMPs	- Padrões moleculares associados a patógenos
pb	- Pares de base
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PRMS	- Moléculas reconhecedoras de patógenos solúveis
PRPs	- Receptores reconhecedores de patógenos
QMA	- Quimioluminescência amplificada
RBV	- Ribavirina
RIG-I	- Receptor do ácido retinóico indutível do gene 1
RNA	- Ácido ribonucleico
RS	- Resposta sustentada
SD	- Desvio padrão
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único
STAT	- Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
Td	- Temperatura de dissociação
TLR3	- Receptor semelhante a Toll 3
TMB	- Tetrametilbenzidina
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VHB	- Vírus da hepatite B
VHC	- Vírus da Hepatite C
vs	- Versus

RESUMO

A hepatite pelo vírus C (VHC) é a maior causa de doença hepática e de transplante hepático no mundo todo. Grande parte dos pacientes contaminados pelo VHC desenvolve infecção crônica com viremia persistente. Há evidências de que a imunidade inata, assim como a adaptativa, tenha um papel decisivo na persistência do VHC e no desenvolvimento da lesão hepática. A lectina ligante de manose (MBL) age como um receptor de reconhecimento de microrganismos, tendo importante papel na iniciação, regulação e amplificação da resposta imune inata. A presença de mutações na região promotora e exon 1 do gene (*MBL2*) determina redução na concentração sérica da proteína e conseqüente perda funcional da mesma. Neste estudo, polimorfismos do exon 1 e da região promotora do gene *MBL2* foram avaliados em 102 pacientes do Sul do Brasil com hepatite C crônica e fibrose hepática moderada e (ou) grave, pareados por gênero, idade e grupo étnico com 102 indivíduos saudáveis, seronegativos para VHC. Seis pontos de mutação nas regiões promotora (*X/Y*, *H/L* e *P/Q*) e exon 1 (*A/B*, *A/C* e *A/D*, *B*, *C* ou *D* também chamada como *O*) do gene *MBL2* foram avaliados pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, com sondas de hibridização fluorescentes. A concentração plasmática de MBL foi medida por ensaio imunoenzimático (ELISA). A frequência do genótipo *YA/YO* foi significativamente maior nos pacientes com VHC quando comparados com os controles (32/102, 31,4% vs 17/102, 16,7%, $p = 0,022$, OR 2,29, CI 95% 1,17- 4,46). Além disso, a frequência dos genótipos associados a níveis baixos de MBL no plasma (*XA/XA*, *XA/YO* e *YO/YO*) foi menor em pacientes com fibrose grave grau IV, quando comparada a pacientes com fibrose moderada grau II (4/41, 8,9% vs 6/15, 28,6% $p=0,04$, OR 0,24, CI 95% 0,06 – 0,99) e com o grupo controle (4/41, 8,9% vs 26/102, 25,5%, $p=0,011$, OR 0,29, CI 95% 0,09 – 0,87). Observou-se também associação entre os genótipos *MBL2* contendo mutações *X* ou *O* com falha de resposta ao tratamento com interferon peguilado e ribavirina (5/13, 38,5% vs 19/25, 75%, $p=0,023$, OR 5,01 CI 95% 1,19 – 21,51). Os resultados sugerem associação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e hepatite crônica por VHC, no que tange à progressão da fibrose hepática e à resposta ao tratamento com IFN α peg. e RBV.

Palavras-chave: MBL; Hepatite C; *MBL2*; Fibrose hepática; Interferon α ; Ribavirina.

ABSTRACT

Hepatitis C Virus (HCV) is a major cause of hepatic disease and of liver transplantation worldwide. The majority of patients infected with HCV develop chronic infection with persistent viremia. There is evidence that innate as well as adaptative immunity play a critical role in HCV persistence and liver injury. Mannose-binding lectin (MBL) acts as a microorganism recognition receptor, in the initiation, the regulation as well as in the amplification of innate immune response. In this study we assessed exon 1 and promoter *MBL2* gene polymorphisms, responsible for low MBL concentration, in 102 patients from Southern Brazil with chronic hepatitis C with moderate and severe hepatic fibrosis and in 102 HCV seronegative healthy individuals paired for gender, age and ethnic group with the patients. Six point mutations in the promoter (*X/Y*, *H/L* and *P/Q*) and exon 1 (*A/B*, *A/C* and *A/D*, *B*, *C* or *D* also known as *O*) regions of the *MBL2* gene were evaluated using real-time polymerase chain reaction (PCR) with fluorescent hybridization probes. MBL plasma concentration was measured through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The frequency of the *YA/YO* genotype was significantly higher in HCV patients as compared to controls (31,4% vs 16,7%, $p = 0,022$, OR 2,29, CI 95% 1,17- 4,46). Yet the genotypes associated with low levels of MBL (*XA/XA*, *XA/YO* and *YO/YO*) were significantly decreased in patients with severe fibrosis stage IV, when compared to the patients with moderate fibrosis stage II (4/41, 8,9% vs 6/15, 28,6% $p = 0,04$, OR 0,24, CI 95% 0,06 – 0,99) and to the control group (4/41, 8,9% vs 26/102, 25,5%, $p = 0,011$, OR 0,29, CI 95% 0,09 – 0,87). Furthermore, *MBL2* genotypes containing *X* or *O* mutations were found associated with non-responsiveness to interferon peguylated and ribavirin treatment (5/13, 38,5% vs 19/25, 75%, $p = 0,023$, OR 5,01 CI 95% 1,19 – 21,51). The results suggest an association between *MBL2* gene polymorphisms and chronic HCV hepatitis, regarding the progression of liver fibrosis and the response to therapy with IFN α peg. and RBV.

Key words: MBL; Hepatitis C; *MBL2*; Hepatic fibrosis; Interferon α ; Ribavirin.

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (VHC) tem sido reconhecido como um grande problema de saúde pública mundial, em função de sua alta prevalência, estimada em 2%, e elevado risco de evolução para cirrose, falência hepática e desenvolvimento de hepatocarcinoma.

Cerca de 80% dos indivíduos infectados pelo VHC persistem indefinidamente com o vírus. Este grande risco de cronicidade viral deve-se tanto à falha na resposta imune do hospedeiro como à capacidade do VHC sobrepujar as defesas imunológicas do hospedeiro (GRAKOU, 2004; GREMION e CERNY, 2005).

Estudos demonstram que mecanismos imunes inatos plasmáticos e intracelulares têm papel importante no controle da infecção pelo VHC (GALE JR. e FOY, 2005). Sabe-se que o VHC apresenta diversas estratégias para se evadir destas respostas e instalar-se no hospedeiro (CHISARI, 2005; GALE JR. e FOY, 2005). Entre as moléculas que participam do sistema imune inato, a lectina ligante de manose (MBL) age como uma importante molécula de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPs*) (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006).

A molécula de MBL possui sítios de reconhecimento para açúcares como manose e N-acetil-D-glucosamina presentes na superfície de diferentes microrganismos, incluindo os vírus. Após a interação da MBL com moléculas alvo, multímeros superiores de MBL (tetrâmeros ou mais) podem ativar o sistema complemento pela ligação com serina proteases (MASP-1, MASP-2, MASP-3 e Map19). Esta ativação pode levar à destruição do patógeno por meio do complexo de ataque à membrana e (ou) por fagocitose mediada pelo complemento, através de depósito aumentado de fragmentos opsonizantes de C3. A interação da MBL ao microrganismo pode induzir diretamente a sua opsonização e fagocitose. Além disso, sabe-se que a MBL é capaz de modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de promover apoptose (WORTHLEY, BARDY e MULLIGHAN, 2005; GARRED et al., 2003; TURNER, 2003).

Deficiência congênita de MBL ocorre em até 10% da população e está associada a três polimorfismos de base única (SNPs) no exon 1 do gene: *MBL2*D*

(Arg52Cys), *B* (Gly54Asp) e *C* (Gly57Glu). Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) *D*, *B* e *C* têm sido coletivamente chamados de *O*, enquanto o alelo normal deste locus é denominado *A*. Estes polimorfismos alteram a polimerização da proteína, acarretando redução na capacidade de ativação do complemento e na capacidade de ligação aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (LARSEN et al., 2004; TERAJ et al., 2003). A concentração da proteína no soro é também modulada por três SNPs na região promotora do gene: *MBL2*H/L* (posição-550) *X/Y* (posição-221) e *P/Q* (posição+4) (JULIGER et al., 2000; MADSEN et al., 1995).

Haplótipos/genótipos relacionados à deficiência de MBL têm sido associados à suscetibilidade e (ou) gravidade de várias imunodeficiências, doenças autoimunes e doenças infecciosas, tanto em adultos como em crianças (EISEN e MINCHINTON, 2003; KILPATRICK, 2002a e b). Por outro lado, os mesmos haplótipos/genótipos foram encontrados associados à proteção contra doenças crônicas como a hanseníase (DORNELLES, PEREIRA-FERRARI e MESSIAS-REASON, 2006; GARRED et al., 1994; MESSIAS-REASON et al., 2007), a tuberculose (EISEN e MINCHINTON, 2003; SOBORG et al., 2003) e a leishmaniose visceral (SANTOS et al., 2001). Supõe-se que, nessas doenças causadas por agentes intracelulares, a deficiência de MBL teria efeito protetor contra a infecção por promover menor internalização do microrganismo na célula (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

O papel da MBL na infecção pelo VHC ainda não está bem elucidado. Neste estudo procurou-se avaliar esta questão, investigando-se a participação da MBL tanto na suscetibilidade quanto no curso evolutivo da hepatite C, bem como a relação com a resposta ao tratamento medicamentoso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a existência de associação entre polimorfismos do gene *MBL2* e hepatite C crônica, em pacientes euro-brasileiros do Sul do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar possível associação entre polimorfismos da região promotora (*X/Y*, *H/L* e *P/Q*) e exon 1 (*A/B*, *A/C* e *A/D*) do gene *MBL2* com formas evolutivas crônicas da infecção pelo VHC;
- b) determinar possível existência de associação entre esses polimorfismos do gene *MBL2* e o grau de fibrose hepática nos pacientes investigados;
- c) avaliar se os polimorfismos do gene *MBL2* investigados estão associados à resposta ao tratamento com IFN α ou IFN α peg. associado à RBV em pacientes com hepatite C crônica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)

Desde a descoberta do VHC há pouco mais de 15 anos muitos avanços na caracterização e no controle da hepatite C foram feitos (MORADPOUR et al., 2001). No entanto, a natureza da resposta imune ao VHC ainda não é totalmente compreendida, o que tem dificultado a obtenção de medidas terapêuticas e profiláticas mais eficazes. Técnicas *in vitro* de infecção pelo VHC foram recentemente desenvolvidas e deverão ajudar a esclarecer essas questões nos próximos anos (LINDENBACH e RICE, 2005).

3.1.1 Estrutura Viral

A partir da década de 1970, reconheceu-se que muitos casos de hepatite pós-transfusional não estavam relacionados aos vírus A, B ou a outros vírus conhecidos, passando-se a empregar o termo Hepatite não-A não-B (HNANB) para estes casos (ALTER et al., 1975; PRINCE et al., 1974). Somente em 1989, por meio de técnicas de biologia molecular, é que o principal agente causador das HNANB foi identificado e então denominado vírus C (KUO et al., 1989).

O VHC é um vírus RNA, da família *Flaviviridae* e único representante do gênero *Hepacivirus* (SHUKLA, HOYNE e WARD, 1995). Seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA, com cerca de 9.400 nucleotídeos, e polaridade positiva (CHOO et al., 1989; TAKAMIZAWA et al., 1991).

As extremidades 5' e 3' não codificam proteínas e são denominadas regiões não-traduzidas (NTR). Estudos demonstram que essas regiões apresentam pouca diversidade entre diferentes isolados virais e têm papel importante na replicação viral (TSUKIYAMA-KOHARA et al., 1992) - figura 1.

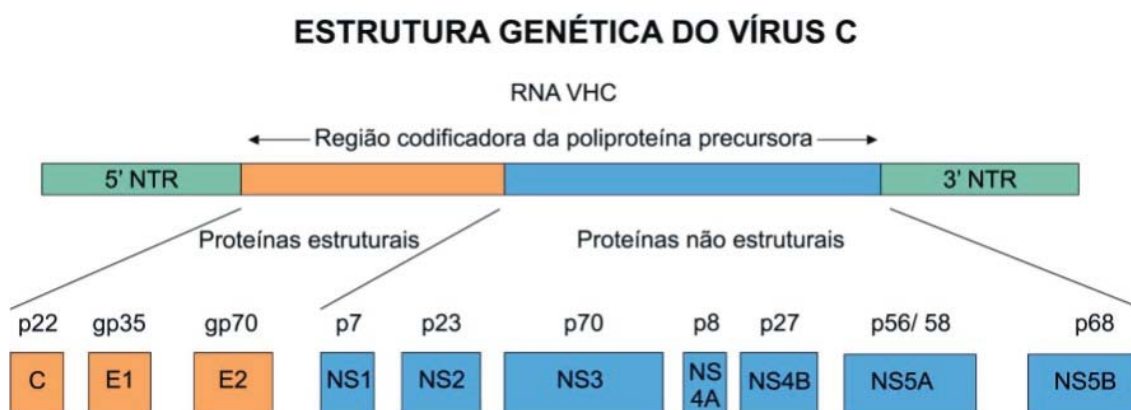
O genoma do VHC apresenta entre as NTR 5' e 3' uma longa região de fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína com aproximadamente 3.000 aminoácidos. Esta poliproteína posteriormente é clivada, mediante a ação de enzimas virais e do hospedeiro, e dá origem a três proteínas estruturais e sete não-estruturais.

As proteínas estruturais, nucleocapsídeo viral e envelope (E1 e E2), provêm do quarto amino-terminal da poliproteína, e as não-estruturais NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B, da parte restante da proteína (MORIYA et al., 1998; BODE, BRENNENDORFER e HAUSSINGER, 2007) - figura 1.

Glicoproteínas E1 e E2 compõem o envelope viral. A extremidade amino-terminal da proteína E2 contém uma região com 34 aminoácidos, correspondente à região hipervariável 1 (HVR1) do genoma viral, onde surgem variantes por mutações ao acaso e seleção dos mutantes capazes de escapar aos anticorpos neutralizantes (WEINER et al., 1991).

Já a proteína NS3 tem atividade de helicase, enzima importante na replicação viral (KIM et al., 1995). Supõe-se que a proteína NS5A determine a sensibilidade viral ao tratamento com interferon (ENOMOTO et al., 1995 e 1996; PAWLOTSKY et al., 1998; IBARROLA et al., 1999; BLIGHT, KOLYKHALOV e RICE, 2000), enquanto a proteína NS5B do VHC tem características de RNA polimerase; enzima esta responsável pela replicação viral (BEHRENS, TOMEI e DE FRANCESCO, 1996).

FIGURA 1 - ESTRUTURA GENÉTICA DO VÍRUS C



FONTE: Modificada de Anzola e Burgos (2003)

NOTA: Gene do VHC, com extremidades 5' e 3' correspondente a regiões não-traduzidas (NTR) e região codificadora da poliproteína precursora, responsável pela produção de proteínas virais estruturais e não-estruturais.

A replicação dos vírus RNA, como é o caso do VHC, não envolve mecanismos de reparo. Isto acarreta uma porcentagem muito maior de erros de incorporação de nucleotídeos que nos vírus DNA. Portanto, o VHC tem alta heterogeneidade genética, com uma taxa de mutação no organismo humano estimada em $1,92 \times 10^3$ sítios de

nucleotídeos por ano (OGATA et al., 1991). Esta taxa é cerca de 100 vezes superior à encontrada no vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Esta diversidade genética não é uniformemente distribuída em todo genoma viral. As regiões não-codificantes, em especial a região 5', são bem conservadas, enquanto as regiões do envelope, em especial a do HVR1, têm alta taxa de mutação. O VHC é classificado em seis genótipos e vários subtipos, baseados na análise de regiões do genoma viral como o core, E1, NS4, NS5 e 5' NTR (SIMMONDS et al., 1993). Os genótipos não estão relacionados com a severidade da doença mas são preditores da resposta ao tratamento com interferon e ribavirina (BOWDEN e BERZSENYI, 2006). No Brasil o genótipo um é observado em 70% dos pacientes infectados, seguido pelos genótipos três (em 25% dos casos) e dois (em 5% dos casos). Na região Sul do país, excepcionalmente, o genótipo predominante é o três (CAMPIOTTO et al., 2005).

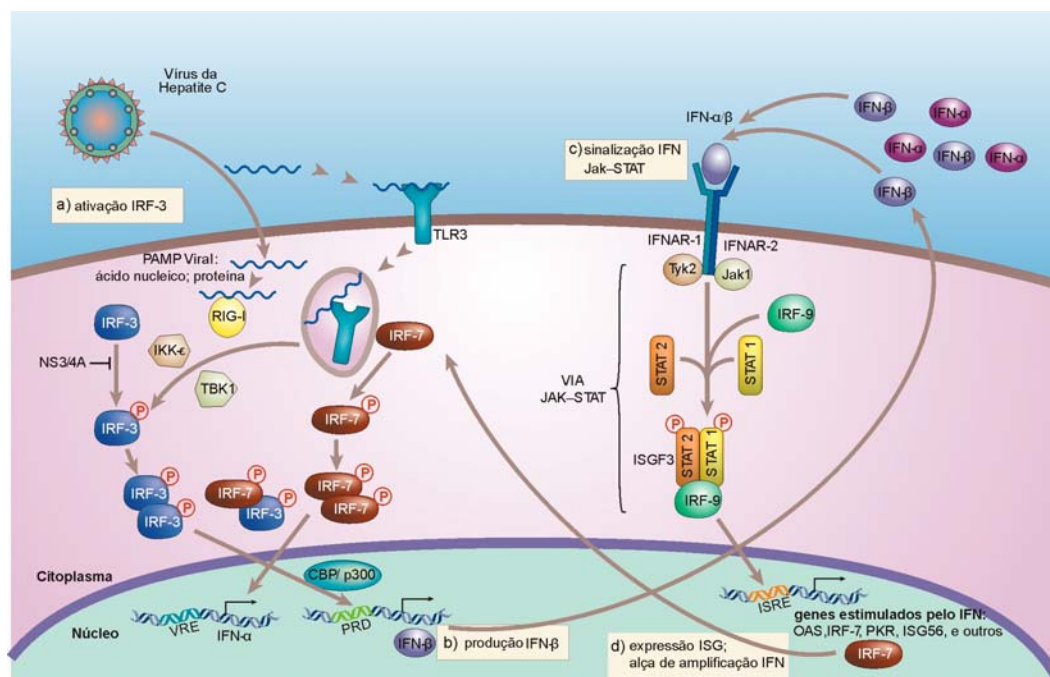
É importante destacar que o VHC circula, num mesmo indivíduo, como uma população de genomas diferentes porém muito relacionados, chamados de quasispécies, cujas seqüências diferem somente por alguns nucleotídeos (MARTELL et al., 1992). Estas variantes podem ser determinadas por uma combinação entre a adaptação viral e a resposta à pressão do sistema imunológico (LYRA, FAN e DI BISCEGLIE, 2004). A existência de populações de quasispécies de VHC dificulta o desenvolvimento de vacinas e favorece a permanência do vírus no organismo humano.

3.1.2 Patogênese da Infecção Viral

Durante muito tempo estudos sobre a replicação e patogênese do VHC foram prejudicados pela falta de um sistema de cultura de célula *in vitro* eficiente e seguro. Além disso, o chimpanzé por muito tempo foi o único animal de experimentação. No ano de 2005, três grupos independentes desenvolveram um sistema de infecção *in vitro* (ZHONG et al., 2005; LINDENBACH et al., 2005; WAKITA et al., 2005). Novos modelos de pesquisa em animais, em camundongos transgênicos, têm sido também desenvolvidos (KREMSDORF e BREZILLON, 2007). O período atual é, portanto, excelente para a pesquisa do VHC, e os resultados desses estudos provavelmente fundamentarão estratégias melhores para combater o vírus e erradicar a doença (LINDENBACH e RICE, 2005).

Após a contaminação pelo VHC, o organismo humano responde de uma forma seqüencial na tentativa de destruir o vírus. A primeira linha de defesa, com um papel crucial no controle do VHC, é a imunidade inata. Thomson et al. (2003) chegaram a demonstrar que a eliminação do VHC em chimpanzés pode ocorrer sem a participação da imunidade adquirida. A imunidade inata intervém por meio de vários mecanismos inespecíficos como produção de interferons, ativação de células NK e ativação de células dendríticas, ativação do sistema complemento, entre outros. Os diversos processos moleculares que sinalizam a resposta inata do hospedeiro à infecção ao VHC encontram-se na figura 2.

FIGURA 2 - PROCESSOS MOLECULARES QUE SINALIZAM A RESPOSTA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO PELO VHC



FONTE: Adaptado de Gale Jr e Foy (2005).

NOTA: O RNA do VHC é reconhecido pelo sistema imune inato por meio dos receptores, RIG-1 (*retinoic acid inducible gene 1*) e (ou) TLR3 (Receptor semelhante a Toll 3) e iniciam sinais que induzirão resposta com produção de IFN α e IFN β . Estes sinais são responsáveis pela fosforilação e ativação de várias proteínas, responsáveis pela expressão de genes que inibem a replicação do VHC. O IFN β liga-se ao receptor de IFN α e β na superfície da célula infectada e sinaliza a ativação de proteínas quinases (Tyk2 e Jak1) que induzem a fosforilação de determinadas proteínas citoplasmáticas, transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1 e 2 (STAT1 e STAT2). As STATs formam um dímero que se direciona para o núcleo da célula e forma um complexo chamado gene estimulado por interferon fator 3 (ISGF3) trimérico (SEN, 2001) que se liga ao elemento estimulador de resposta ao interferon (ISRE) em genes alvos para direcionar expressão de genes estimulados por ISGs. Os produtos dos ISGs aumentam a eficiência de processos que limitam a replicação viral, impedindo, por exemplo, a transcrição do RNA e (ou) inibindo a síntese da fita de RNA antígenoômica. (GALE JR. e FOY, 2005). Um dos ISG é o fator regulatório do interferon-7 (IRF-7), que também é um fator de transcrição. A fosforilação, dimerização e heterodimerização com o IRF-3 resultam na produção de vários subtipos de IFN α .

A administração terapêutica de IFN α provê ação antiviral contra o VHC mediante a sinalização da expressão do gene estimulado pelo interferon (ISG) pelo receptor IFN α/β e da via Jak-STAT. A ablação da sinalização do RIG-I e TLR3 pela protease NS3/4A do VHC bloqueia a ativação do fator regulatório do interferon-3 (IRF-3) e atenua a resposta do hospedeiro à infecção (GALE JR. e FOY, 2005).

O VHC multiplica-se principalmente no fígado, mas também em linfócitos do sangue periférico (LINDENBACH e RICE, 2005), células epiteliais do estômago (DEFORGES et al., 2004) e do sistema nervoso (FORTON et al., 2004). No fígado humano, observa-se uma grande proporção de células matadoras naturais (NK) que promovem a ativação das células dendríticas e iniciam a resposta imune adaptativa (ROSEN, 2003).

Acredita-se que a reatividade dos linfócitos T citotóxicos ou CD8 é fundamental para a eliminação do VHC sem o que pode ocorrer evolução para a cronicidade da infecção. A eliminação do VHC pelas células T CD8 ocorre por dois mecanismos: indução de apoptose dos hepatócitos infectados e supressão da replicação pela produção de IFN-gama (MISSALE et al., 1996).

Quando as células CD4 respondem de forma vigorosa e duradoura à infecção pelo VHC são responsáveis pela eliminação viral já na fase aguda. A perda de reatividade das células T CD4 tem sido associada à persistência do vírus e progressão do dano hepático.

A resposta imune humoral começa a ser detectável após seis a oito semanas da contaminação pelo VHC. Observam-se altos títulos de anticorpos específicos para o VHC, mas nenhum com poder de levar à cura da infecção (ROSEN, 2003).

3.1.3 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infecção pelo VHC afeta aproximadamente 123 milhões de pessoas sendo a prevalência mundial em torno de 2% (PERZ e ALTER, 2006).

Embora o VHC seja um vírus endêmico no mundo todo, há uma grande variabilidade geográfica na sua distribuição. Os locais de prevalência mais alta são a África e a Ásia, com prevalências variáveis entre 3,2% na China (XIA et al., 1996) e 22% no Egito (FRANK et al., 2000). Áreas de baixa prevalência incluem a América do Norte e o norte e o oeste da Europa e Austrália, onde se tem encontrado prevalências entre 0,6 e 1,8% (ALTER et al., 1999).

No Brasil, a prevalência de anti-VHC em doadores de sangue varia de acordo com a região geográfica. Na Região Sul, de 1,1 a 2,1%; na Região Sudeste, 0,8 a 2,8%; na Região Nordeste, 1,7 a 3,4% e na Região Norte, de 0,9 a 2,4% (CARRILHO e CORRÊA, 1998; BRANDÃO e FUCHS, 2002).

Foccacia et al. (1998) estimaram que a prevalência de infecção pelo VHC na população geral de São Paulo era de 1,4% em 1998.

Houve aumento na incidência da hepatite C a partir dos anos 80, e declínio na década de 1990. Acredita-se que nos próximos anos deva ocorrer um aumento das conseqüências desta infecção, como cirrose e hepatocarcinoma, visto ser a hepatite C uma doença de longa evolução (SHEPARD, FINELLI e ALTER, 2005; DEUFFIC et al., 1999; SPADA et al., 2001).

3.1.3.1 Transmissão e fatores de risco

A transmissão do VHC é predominantemente parenteral. Os fatores de risco mais freqüentemente associados à hepatite C são: transfusão sangüínea a partir de doadores não-selecionados, uso de drogas injetáveis e injeções terapêuticas realizadas de forma não-estéril. Nos países desenvolvidos o fator de risco mais comum nas últimas décadas foi o uso de drogas injetáveis, já nos países em desenvolvimento foram as injeções terapêuticas não-seguras e a transfusão sangüínea (WASLEY e ALTER, 2000).

A transmissão do VHC por meio de exposição ocupacional (0,3%) (KIYOSAWA, 1991), perinatal (2,7 a 8,4%) (FERRERO, 2003) ou sexual ocorre de forma bem menos freqüente (TERRAULT, 2002; VANDELLI et al., 2004) sendo que em cerca de 40% dos casos a forma de transmissão é desconhecida (WASLEY e ALTER, 2000).

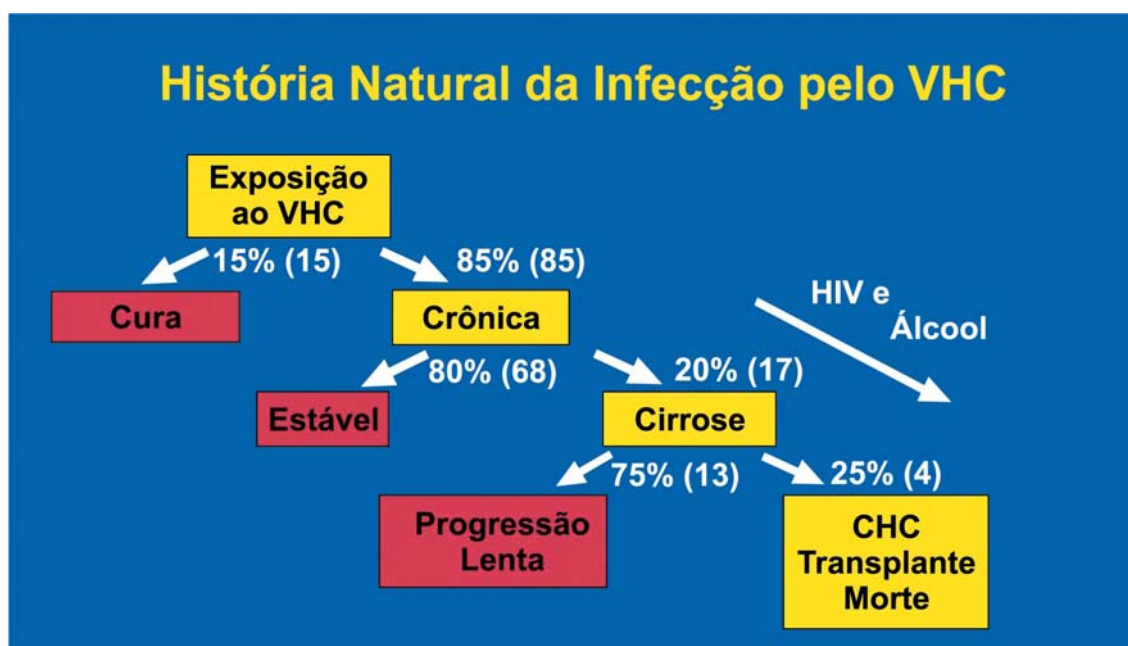
Existe um grande número de atividades humanas que envolvem potencial exposição percutânea a sangue ou a outro fluido corporal derivado de sangue, como no caso de procedimentos cosméticos, tatuagens, piercing, acupuntura entre outros, que talvez contribuam na transmissão do VHC. Contudo, os estudos para determinar a relevância destes fatores de risco na transmissão global do VHC são ainda insuficientes e apresentam resultados conflitantes (SHEPARD, FINELLI e ALTER, 2005; KALDOR et al., 1992).

3.1.4 História Natural

A evolução da infecção pelo VHC é muito variável. Sabe-se que uma proporção de indivíduos infectados elimina o vírus espontaneamente, geralmente nos primeiros meses após a contaminação. As taxas de cura variam entre 14% a 46%. Fatores relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao vírus parecem estar implicados nesta evolução (SEEFF, 2002).

Os fatores do hospedeiro associados à maior probabilidade de cura espontânea são: sexo feminino, baixa idade, certos tipos de antígenos leucocitários humanos (HLA) e uma vigorosa resposta imune. Já a imunossupressão pode estar associada a um mau prognóstico, visto que pacientes co-infectados com HIV têm altas taxas de cronificação (DI BISCEGLIE, 2002; CRAMP, 1999; BARRETT, RYAN e CROWE, 1999).

FIGURA 3 - HISTÓRIA NATURAL DA HEPATITE C



FONTE: Adaptada de Alter (1995)

NOTA: Evolução da infecção pelo VHC desde a contaminação, progressão para hepatite crônica, cirrose e falência hepática. A co-infecção com HIV e o abuso alcoólico podem acarretar evolução mais rápida da doença.

A hepatite aguda pelo VHC é em geral assintomática, sendo que somente 25% dos casos apresentam sintomas típicos de hepatite, com uma fase icterícia (AFDHAL, 2004).

Grande parte dos pacientes (cerca de 80%) diagnosticados como infecção por VHC já está na fase crônica. A hepatite crônica pelo VHC também é, em geral, assintomática ou tem sintomas inespecíficos. Dentre estes, a fadiga é o sintoma que mais se destaca, podendo ser muito intensa. Outros sintomas descritos incluem: artralgias, parestesias, mialgias, prurido e leve déficit neurocognitivo. Existem também relatos de associação da infecção crônica por VHC com outras doenças extra-hepáticas como crioglobulinemia, glomerulonefrite membranoproliferativa (POYNARD et al., 2002; PICHE et al., 2002; KRAMER et al., 2002).

A evolução da doença hepática crônica costuma ser lenta e relacionada à progressão da fibrose. Assim que a infecção crônica fica estabelecida, há um risco geral de evolução para cirrose e posteriormente insuficiência hepática, que ocorre em torno de 20% a 50% dos casos, nos primeiros 10 a 20 anos de infecção. Mais uma

vez, fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus parecem estar implicados nesta progressão (AFDHAL, 2004).

Entre os fatores relacionados à progressão da hepatite C crônica incluem-se: sexo masculino; infecção pelo VHC em idade mais avançada; obesidade, ou esteatose hepática; co-infecção com HIV; co-infecção com vírus da hepatite B (VHB); consumo alcoólico e excesso de ferro (ROUDOT-THORAVALL, 1997).

Em relação ao efeito do álcool na evolução da fibrose, vários pesquisadores demonstraram que o consumo diário moderado ou elevado de álcool (acima de 20g para a mulher e 40g para o homem) tem um efeito aditivo ou sinérgico no aumento da fibrose em pacientes com hepatite C (POYNARD, BEDOSSA e OPOLON, 1997; PETERS e TERRAULT, 2002).

A maior causa de mortalidade nos pacientes com co-infecção HIV e VHC é a doença hepática crônica severa, mesmo quando tratados com terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART) (JAGGY et al., 2003; MACÍAS et al., 2002).

Sabe-se que a co-infecção VHC e VHB desenvolve doença hepática crônica de maior gravidade e maior risco de evolução ao hepatocarcinoma do que se ambas as doenças ocorressem de forma isolada (ZARSKI et al., 1998; DONATO, BOFFETTA e PUOTI, 1998).

Após evolução para cirrose, progressivamente observa-se o desenvolvimento de sinais de falência hepática, como ascite e sangramento por varizes de esôfago. A evolução para falência hepática ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes com cirrose em um período de 10 anos (DI BISCEGLIE, 2003). Nenhum fator de risco específico foi identificado para esta progressão.

O hepatocarcinoma (HCC) é outra complicação séria de hepatite crônica pelo VHC, e geralmente está associado à cirrose hepática. A incidência anual de hepatocarcinoma em pacientes cirróticos está em torno de 1,4% a 6,9%, e a sobrevida nestes casos costuma ser abaixo de 5% em cinco anos (DI BISCEGLIE, 2003).

3.1.5 Diagnóstico

Em função de a hepatite C ser geralmente assintomática, o diagnóstico é muitas vezes fortuito e realizado na ocasião de uma doação de sangue, na investigação de pacientes com transaminases elevadas ou na avaliação de pessoas com fatores de risco para infecção pelo VHC.

O teste de triagem para avaliação da presença do VHC é a pesquisa de anticorpos anti-VHC, em pelo menos duas amostras, o que pode ser realizado por meio de técnicas de imunoensaio enzimático (EIA) de segunda ou terceira geração. Este teste é menos sensível em indivíduos imunocomprometidos ou em pacientes renais crônicos e nos casos suspeitos de hepatite C aguda, pois em mais de 90% desses pacientes os anticorpos anti-VHC só aparecem após o terceiro mês da contaminação. Estes anticorpos podem desaparecer após a eliminação do vírus (TAKAKI et al., 2000).

Para comprovar a presença do VHC nos casos com positividade ao anticorpo anti-VHC deve-se realizar a pesquisa do RNA viral pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com transcrição reversa (PCR). Este teste permite a detecção e (ou) a quantificação do RNA viral já na primeira ou segunda semana da exposição inicial ao vírus (McHUTCHISON, 2004).

Os pacientes com hepatite C geralmente têm elevação dos níveis da alanina amino transferase (ALT) e da aspartato amino transferase (AST), a partir da quarta até a 12.^a semana da contaminação com o VHC, e a elevação das ALT e AST pode oscilar na fase crônica. A persistência da elevação das transaminases sugere agressão hepática e deve ser melhor avaliada por meio de exame histológico do fígado.

A histologia hepática é o teste padrão-ouro para determinar o estágio, o grau de atividade, bem como realizar o diagnóstico diferencial da hepatite crônica. Os resultados deste exame fundamentam a necessidade de tratamento medicamentoso, de acordo com o grau de atividade inflamatória e de fibrose. Algumas alterações histológicas sugerem infecção pelo do VHC, tais como: a) presença de agregados ou folículos linfóides portais; b) lesões no epitélio de ductos biliares; c) esteatose e d)

componente necroinflamatório lobular (SCHEUER et al., 1992; LEFKOWITCH et al., 1993). Existem diferentes classificações das hepatites crônicas, algumas que incluem avaliações mais complexas e detalhadas, como a classificação de Ishak (ISHAK et al., 1995), outras com abordagens mais amplas, facilmente compreensíveis e mais reprodutíveis, como a Metavir (BEDOSSA e POYNARD, 1996) ou ainda a classificação nacional da Sociedade Brasileira de Patologia (GAYOTTO, 2000). Todas foram criadas pela necessidade de parâmetros mais objetivos, reproduzíveis e relacionados aos aspectos clínico-terapêuticos da hepatite C.

3.1.6 Tratamento

O objetivo principal do tratamento da hepatite C crônica é a prevenção de complicações tardias pela erradicação do VHC, o que é conseguido em quase metade dos casos tratados com a terapia corrente (FONTAINE et al., 2001).

O tratamento para hepatite C é definido com base nos resultados do genótipo do VHC. Pacientes com genótipo 2 ou 3 respondem melhor ao tratamento, em especial casos com genótipo 2 do que pacientes com genótipo 1. Ou seja, os genótipos 2 e 3 têm maior frequência de taxa de resposta sustentada (RS), isto é, não-deteção do VHC após o sexto mês de tratamento, do que nos casos com o genótipo 1. Além disso, pacientes com genótipo 2 ou 3 respondem ao tratamento em período de tempo menor que pacientes com genótipo 1 (24 meses, em vez de 48 meses). A RS ao tratamento de pacientes com os demais genótipos não é bem definida, sendo estes geralmente tratados como os casos de VHC com genótipo 1. Os pacientes com genótipo 3 desenvolvem com maior frequência esteatose hepática e, dependendo da intensidade deste depósito, a lesão hepática pode ser mais acentuada (SHARMA et al., 2004).

A única terapia efetiva até o momento está embasada no uso do IFN α . O IFN α foi o primeiro a ser usado no tratamento para hepatite não-A não-B em 1986, três anos antes de o vírus C ser identificado (HOOFNAGLE et al., 1986). Por meio da

monoterapia com interferon, obtinha-se uma taxa de resposta sustentada (RS) de somente 10% a 20% dos casos, com altas taxas de recaída (CARITHERS e EMERSON, 1997).

Em 1998, demonstrou-se que a administração do IFN α associado a um análogo de nucleosídeo (ribavirina) elevava mais do que duas vezes a taxa de resposta ao tratamento, em pacientes sem tratamento anterior, quando comparada ao uso isolado do interferon (McHUTCHISON, 1998). Outro avanço no tratamento da hepatite C crônica foi a introdução do IFN α peg. A adição de uma cadeia de polietileno glicol à molécula de interferon aumentou sua atividade biológica e meia vida (SHIFFMAN, 2001). Observou-se uma melhora na taxa de resposta viral sustentada que era de 43% com o IFN α e RBV para 55% com o IFN α peg. e RBV de acordo com dois estudos multinacionais, controlados e randomizados IFN α peg. de dois laboratórios farmacêuticos diferentes (MANNS, CORNBERG e WEDEMEYER, 2001; FRIED et al., 2002).

A interrupção precoce do tratamento é indicada já na décima segunda semana, mediante a análise da resposta virológica rápida, ou seja, negatificação ou queda de dois logaritmos da carga viral pré-tratamento. Caso não ocorra esta resposta, a probabilidade de RS é de 3% e, portanto, o tratamento deve ser interrompido, em especial nos pacientes com genótipo 1 (MANNS, CORNBERG e WEDEMEYER, 2001; FRIED et al., 2002; DAVIS et al., 2003; WONG et al., 2003). Atualmente estudos indicam que avaliação da resposta já na quarta semana de tratamento poderia definir quais seriam os pacientes com maior chance de RS mais rápida ou lenta. Conseqüentemente estes casos teriam uma redução ou aumento no período habitual de tratamento (MOUCARI et al., 2007).

O tratamento preferencial para pacientes com genótipo 1 é o IFN α peg. associado a RBV, sendo que a dose da ribavirina deve ser ajustada de acordo com o peso. Deve-se manter o tratamento por 48 semanas quando houver resposta virológica precoce; quando este não for o caso, o tratamento deverá ser suspenso.

Já os pacientes com genótipos 2 ou 3 podem apresentar bons resultados tanto com o IFN α quanto IFN α peg. quando associado à RBV, por 24 semanas. No entanto, casos com genótipo 3 e cirrose hepática têm resposta mais difícil e o tratamento deve ser feito especificamente com IFN α peg. e RBV por 48 semanas. (MANNS, CORNBERG e WEDEMEYER, 2001; FRIED et al., 2002; HADZIYANNIS et al., 2004).

Desde 1999, o Ministério da Saúde do Brasil distribui gratuitamente os medicamentos para hepatite C por meio das Secretarias de Saúde Estaduais. Em 21 de junho de 2002 foi publicado um protocolo nacional regulamentando o tratamento da Hepatite C crônica no Brasil, garantindo o direito ao fornecimento gratuito deste tratamento à população (PORTARIA 639, Ministério da Saúde).

Os efeitos colaterais mais comumente encontrados no tratamento são sintomas neuropsiquiátricos, sintomas similares a quadro gripal e anormalidades hematológicas. Vários autores demonstraram que os efeitos colaterais foram responsáveis pela interrupção do tratamento, em 10 a 14% dos casos (MANNS, CORNBERG e WEDEMEYER, 2001; FRIED et al., 2002). Pacientes aderentes ao tratamento, ou seja, os que receberam doses de IFN α e RBV igual ou maior que 80% da prevista e por um tempo igual ou maior do que 80% do estabelecido, têm maior taxa de resposta sustentada (63%) em relação aos menos aderentes (MANNS, CORNBERG e WEDEMEYER, 2001; McHUTCHISON, 2002).

São contra-indicações para o tratamento com INF: doença hepática muito avançada, doença psiquiátrica grave, abuso recente de álcool ou drogas e comorbidades como insuficiência renal (MUIR e PROVENZALE, 2002). Tratamentos mais eficazes contra o VHC com quatro grandes grupos de novos agentes terapêuticos: incluindo IFN α e RBV modificados, imunomoduladores, agentes antifibróticos e agentes com alvo no ciclo de vida do vírus estão em fase de estudos e parecem promissores (PEARLMAN, 2004).

Pacientes com doença hepática mais avançada têm indicação de realizar transplante hepático, sendo esta a indicação atualmente mais comum dos transplantes hepáticos realizados nos EUA. Após o transplante, a infecção pelo VHC costuma comprometer o órgão transplantado. Estudos recentes mostram resultados promissores com tratamento medicamentoso destes casos (BERENGUER, 2007).

3.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL)

O sistema imunológico é constituído por uma organização de células e moléculas com funções especializadas direcionadas na defesa do organismo contra infecções. Nesta defesa há duas respostas distintas e fundamentais: resposta inata (natural) e resposta imune adquirida. A resposta inata ocorre toda vez que um agente infeccioso entra no organismo, havendo a ativação de diferentes células e moléculas proteicas como as do sistema de complemento. Já na resposta adquirida, a reação é voltada especificamente a certos epítomos dos microrganismos através de células T e B altamente específicas, levando à formação de substâncias como os anticorpos (TURNER, 2003).

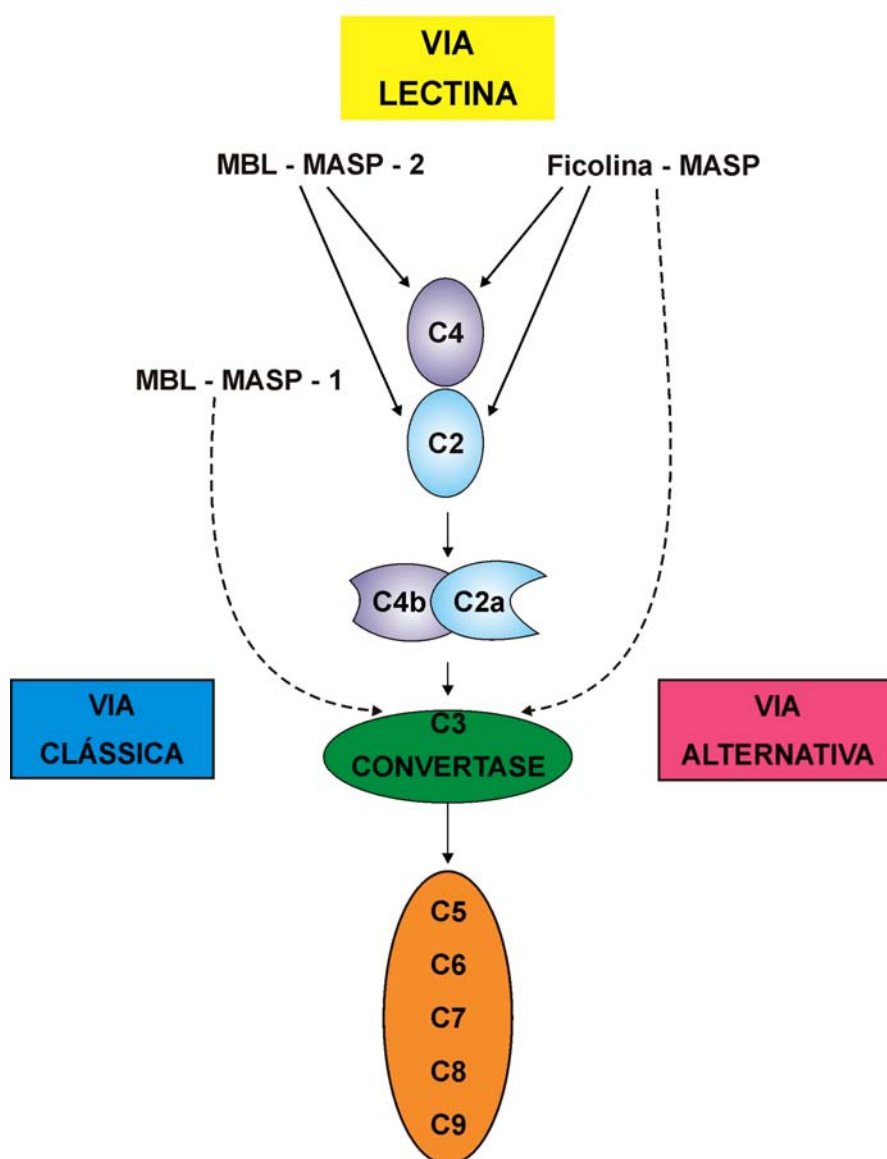
A lectina ligante de manose é um componente importante do sistema imune inato, capaz de ativar o sistema de complemento logo após ter-se ligado a microrganismos. Promove, assim, a terceira via de ativação do complemento, distinta da clássica e da alternativa (WORTHLEY, BARDY e MULLIGHAN, 2005). Com base em estudos filogenéticos, sugere-se que esta deve ter sido a primeira via de ativação do complemento a existir. A relevância biológica da MBL é indicada pelas consequências clínicas associadas às alterações na sua concentração sérica e grau de polimerização (TURNER, 2003; JACK, KLEIN e TURNER, 2001).

3.2.1 Sistema Complemento

O sistema complemento, como o próprio nome sugere, funciona como sistema auxiliar da imunidade, atuando tanto na vigilância direta contra microrganismos quanto pela interação com a imunidade humoral. Este é composto por mais de 30 proteínas de membrana plasmática e, entre elas, a MBL. Muitas são proteases capazes de auto-ativação por clivagem proteolítica, chamadas zimógenos. Os precursores dos zimógenos estão amplamente distribuídos de forma inativa em fluidos e nos tecidos corporais. Estes precursores podem ser ativados diretamente por patógenos ou indiretamente por anticorpos ligados a patógenos nos sítios de infecção. Após a primeira ativação, inicia-se uma cascata de reações enzimáticas na superfície dos microrganismos, as quais induzem uma série de reações inflamatórias. Nestas reações, uma enzima do complemento ativa, gerada pela clivagem do seu precursor zimógeno, cliva seu substrato – outro zimógeno do complemento – em sua forma enzimaticamente ativa. Esta enzima, por sua vez, cliva e ativa o próximo zimógeno na via de ativação. Dessa forma, a ativação de um pequeno número de proteínas do complemento no começo da via é rapidamente amplificada a cada reação enzimática sucessiva, resultando na rápida geração de uma grande resposta (UTIYAMA, MESSIAS-REASON e KOTZE, 2001a e b; CARROLL, 2004). Entretanto, nem todas as proteínas do complemento sofrem clivagem após a ativação, como é o caso da MBL e C1.

Existem três vias diferentes pelas quais o sistema complemento pode ser ativado: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa. Cada via segue uma sequência de reações para gerar uma protease denominada C3 convertase, figura 4.

FIGURA 4 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

VIA DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

FONTE: Adaptada de Dommet, Klein e Turner (2006)

NOTA: Três vias de ativação do complemento. Todas geram C3 e C5 convertases. A via das lectinas pode ser ativada pela interação da MBL com MASP -2 ou da ficolina com MASP que causarão clivagem de C2 e C4 levando a formação do complexo C4b2b e posteriormente C3. A interação da MBL com MASP-1 pode ativar C3 diretamente.

Essas reações iniciais são chamadas eventos precoces da ativação do complemento. Nestas reações, os zimógenos do complemento inativos são sucessivamente clivados para produzir dois fragmentos, sendo o maior deles uma serina-protease ativa, convencionalmente indicada como fragmento "b". A protease ativa é retida na

superfície do patógeno e assegura que o próximo zimógeno do complemento também seja clivado e ativado na superfície do patógeno. Ao contrário, um pequeno fragmento peptídico, denominado de fragmento "a", é liberado do sítio da reação e pode atuar como mediador inflamatório (UTIYAMA, MESSIAS-REASON e KOTZE, 2001a e b; CARROLL, 2004).

A via clássica de ativação do complemento é iniciada pela ligação da proteína C1q à superfície do patógeno ou ao complexo antígeno anticorpo. A proteína C1q faz parte do complexo C1, caracterizado por uma molécula de C1q unida a duas moléculas dos zimógenos C1r e C1s. Apresenta seis cabeças globulares unidas por uma cauda tipo colágeno, que envolvem o complexo C1r e C1s. A ligação de mais de uma cabeça de C1q à superfície do patógeno ou anticorpo causa uma mudança conformacional no complexo C1r e C1s, dando início à ativação enzimática e clivagem de C4 e C2 para gerar dois fragmentos grandes C4b e C2b, que juntos formam a C3 convertase (UTIYAMA, MESSIAS-REASON e KOTZE, 2001a e b; CARROLL, 2004).

A via das lectinas é homóloga à via clássica, ou seja, é iniciada por uma proteína semelhante a C1q. Foi identificada posteriormente às outras duas vias de ativação do complemento. A via é iniciada pela ligação da MBL a carboidratos contendo manose, N-acetil D-glucosamina, D-glucose ou fucose, presentes na superfície de diferentes microrganismos (TURNER, 2003). A MBL, assim como o C1q, é constituída por cadeias polipeptídicas com extremidades globulares semelhantes a buquê de tulipas e forma complexos com proteases zimogênicas. A MBL interage com serinas proteases denominadas MASPs (*MBL – associated serine proteases*), similares a C1r e C1s. A MASP-2 é a responsável pela clivagem de C2 e C4 para formar o complexo C4b2b. Este complexo apresenta atividade de C3 convertase, capaz de estimular a opsonização dos patógenos e desencadear toda cascata do sistema complemento. A via das lectinas também pode ser ativada por outra família de proteínas chamadas de ficolinas, que também formam complexos com MASPs, mas apresentam especificidades de ligação diferentes da MBL (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

A via alternativa é ativada na ausência de anticorpo e o seu início não depende de uma proteína que se ligue ao patógeno. Em vez disso, ela pode ser iniciada pela hidrólise espontânea do C3, o qual por sua vez se associa a outra proteína plasmática chamada fator B, permitindo que a protease plasmática, denominada de fator D, clive o fator B em Ba e Bb. Esta clivagem dá origem ao complexo C3 (H₂O) Bb, que é uma C3 convertase em forma fluida, com atividade sobre C3. Após a clivagem de C3 em C3b e C3a, o fragmento C3b forma ligações covalentes com grupos OH e NH₂ de proteínas e carboidratos em superfícies ativadoras (TURNER, 2003; UTIYAMA, MESSIAS-REASON e KOTZE 2001a e b; CARROLL, 2004).

Portanto, todas as três vias convergem na formação da enzima C3 convertase, que cliva o C3 para produzir o componente ativo do complemento C3b. A ligação de grande número de moléculas de C3b ao patógeno é o evento central na ativação do complemento. Os componentes do complemento ligados, especialmente o C3b e seus fragmentos inativos, são reconhecidos por receptores específicos nas células fagocíticas, que engolfam os patógenos opsonizados pelo C3b e seus fragmentos inativos. Os fragmentos pequenos de clivagem do C3 e C4 e especificamente do C5 recrutam fagócitos aos sítios de infecção e ativam-nos pela ligação a receptores específicos acoplados a proteínas G. Estas atividades reunidas promovem a captação e destruição dos patógenos por fagócitos. As moléculas de C3b que se ligam à C3 convertase iniciam os eventos tardios de ativação do complemento, formando a C5 convertase que gera C5a e C5b. O C5a é um potente mediador da inflamação e o fragmento maior C5b ativa os eventos tardios da cascata do complemento, desencadeando a montagem de um complexo de ataque à membrana, que pode resultar na lise de certos patógenos. As proteínas envolvidas nesta ativação tardia incluem C6, C7, C8 e C9. O complexo C5b,6,7 fica inserido diretamente na bicamada lipídica da membrana plasmática, seguindo-se a inserção instável de C8. Nesta fase pode ocorrer a polimerização de até 15 moléculas de C9 em volta do complexo para

formar poros líticos na membrana, capazes de lisar certos patógenos e células (TURNER, 2003; UTIYAMA, MESSIAS-REASON e KOTZE, 2001a e b; CARROLL, 2004).

A atividade dos componentes do complemento é modulada por um sistema de proteínas reguladoras que impede a lesão tecidual como resultado da ligação inadvertida de componentes ativados do complemento às células do hospedeiro ou da ativação espontânea dos componentes do complemento do plasma. Assim sendo, as principais funções biológicas do complemento incluem:

- a) opsonização de patógenos para que sejam englobados por fagócitos por meio de receptores para complemento (CR1 e CR3);
- b) ativação de fagócitos;
- c) formação de complexo de ataque à membrana levando à formação de poros na bicamada lipídica da membrana e morte de patógenos por lise osmótica;
- d) solubilização e depuração de complexos imunes;
- e) promoção da resposta imune humoral, auxiliando na apresentação de antígenos às células B nos centros germinativos;
- f) eliminação de células apoptóticas pelos macrófagos através da C1q, proteína C reativa, MBL e IgM, contribuindo para a queda da exposição de auto-antígenos ao sistema imunológico (UTIYAMA, MESSIAS-REASON e KOTZE, 2001a e b; CARROLL, 2004; PRODINGER et al., 1999; DUMESTRE-PERARD et al., 2002).

3.2.2 Histórico

Há mais de 60 anos, Frank Burnet e John McCrea receberam o prêmio Nobel por terem identificado três inibidores capazes de neutralizar o vírus influenza no sangue. Sabe-se atualmente que um destes, o Beta inibidor, era, na realidade, a MBL (BURNET e McCREA, 1946). Em 1968, a descrição de uma criança com infecção bacteriana recorrente de causa desconhecida levantou a suspeita da deficiência de um

fator plasmático de proteção (MILLER et al., 1968). Por meio de análises *in vitro*, demonstrou-se que o defeito imune ocorria na opsonização do patógeno e que a infusão de plasma fresco corrigia o problema, resultando em melhora clínica. A mesma deficiência foi detectada na linhagem materna do paciente, sugerindo uma condição herdada. Em 1978, Kawasaki, Etoh e Yamashina (1978) isolaram uma proteína de coelho ligada à manana, que denominaram proteína ligada a manana (*manose binding protein – MBP*). Mais tarde, foi observado que esta seria o fator plasmático de proteção, cuja existência fora presumida por Miller et al. em 1968.

Por meio de estudos posteriores, observou-se que o defeito de fagocitose ligado ao sistema de complemento predispunha a diferentes infecções em crianças (CANDY, LARCHER e TRIPP, 1980; SUMIYA et al., 1991; TURNER, MOWBRAY e ROBERTON, 1981). Em 1987, o grupo de Ikeda (1987) descreveu a função da MBL como ativador do sistema de complemento de forma independente. Posteriormente, Super et al. (1989) demonstraram que o defeito na opsonização era dependente da MBL mediante a administração de MBL purificada. Este achado estimulou a pesquisa da base molecular da deficiência da MBL e, mais recentemente, a descoberta da base genética desta imunodeficiência. A MBP (proteína ligada a manana) passou a ser denominada preferencialmente MBL.

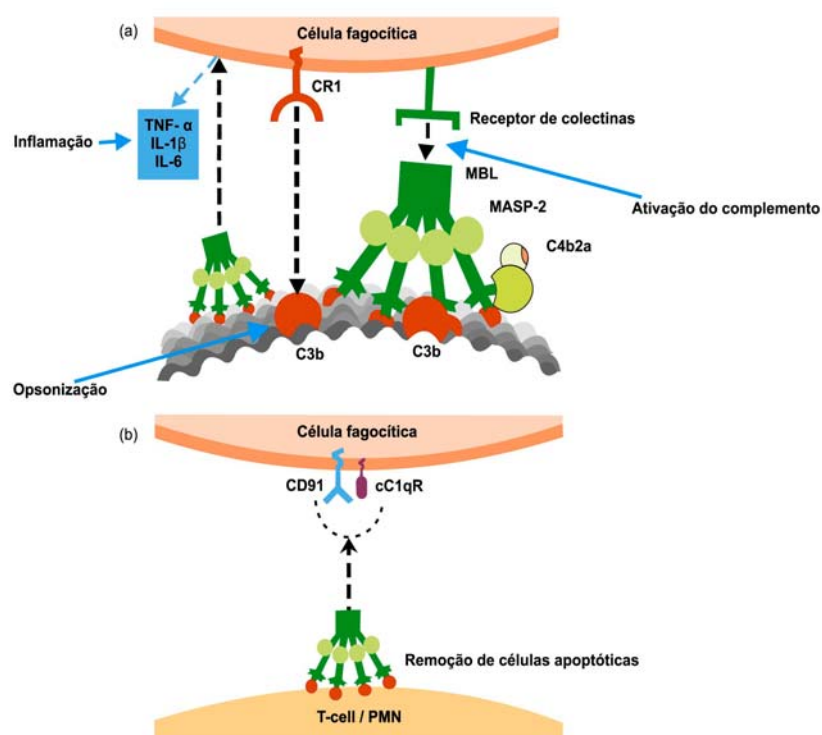
3.2.3 Função da MBL

Atualmente é reconhecido que a MBL tem pelo menos quatro funções distintas:

- a) Ativação do sistema de complemento. Demonstrado por meio de estudos que indicam que a MBL, ao ligar-se a microrganismos leva à autoativação da MASP-2, permitindo a clivagem do C4 e C2 para formar a C3 convertase, que é então ativada diretamente pelo complexo MBL-MASP-1;
- b) Promoção de opsonofagocitose, embora não se sabe ainda se ela funcionaria como uma opsonina direta ou se apenas intensificaria a fagocitose mediada por outras vias do complemento e ou por anticorpos;

- c) Modulação da inflamação mediante a liberação de citocinas pró-inflamatórias dos monócitos;
- d) Promoção de apoptose. Demonstrado por meio de estudos que encontraram a MBL ligada diretamente a células apoptóticas, assim permitindo o seu reconhecimento e facilitando a fagocitose por macrófagos (TURNER, 2003; DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006), figura 5.

FIGURA 5 - FUNÇÕES DA MBL



FONTE: Adaptada de Turner (2003)

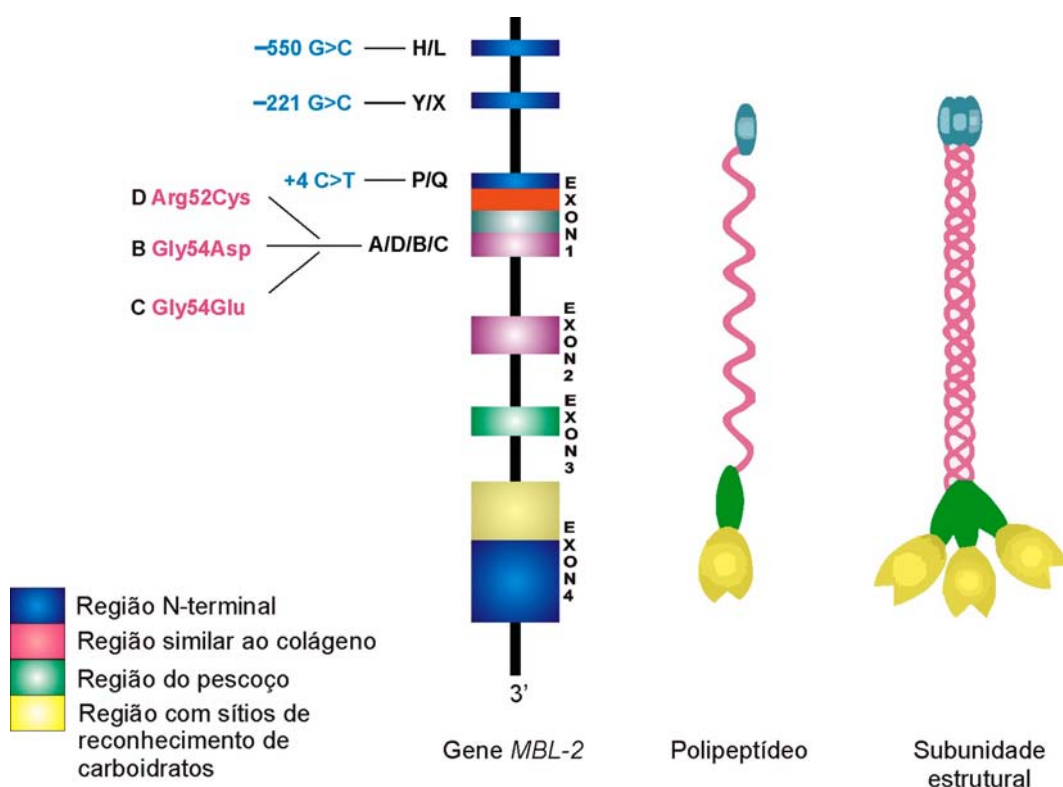
NOTA: a) MBL ligada a superfície do microrganismo realiza opsonofagocitose por dois mecanismos. O mais importante é a ativação do sistema de complemento, via lectina. Isso é mediado pela MASP2 e acarreta formação de c4b2a. Conseqüentemente ocorre clivagem do C3 e formação de fragmentos de C3b que se ligam covalentemente à superfície do organismo. Estes fragmentos são reconhecidos por receptores do fagócito. Opsonofagocitose direta pela MBL tem sido proposta por muitos estudos, ainda que não se tenha identificado o receptor da colectina envolvido. A MBL também promove inflamação por meio da modulação da liberação de citocinas pelos monócitos; b) papel da MBL na apoptose. A MBL se liga a células T apoptóticas e neutrófilos polimorfonucleares. A ligação com fagócitos mononucleares requer reconhecimento da região colagênica da MBL por determinados receptores.

3.2.4 Estrutura Protéica da MBL

A MBL é uma glicoproteína classificada como lectina do tipo C ou cálcio-dependente, que pertence à família das colectinas por apresentar uma região colagenosa e outra com sítio de reconhecimento de carboidratos. É uma macromolécula, com estrutura semelhante a um buquê, da mesma forma que a molécula C1q. É sintetizada preferencialmente no fígado.

A subunidade estrutural de MBL é um homotrímero com três cadeias polipeptídicas idênticas de 32 kDa., Figura 6. Cada cadeia é caracterizada por quatro regiões, sítios ou domínios: a) Região C-terminal, contendo o domínio ou sítio de reconhecimento de carboidrato (CRD); b) região do pescoço, hidrofóbica; c) região similar ao colágeno; d) região N-terminal, rica em cisteína.

FIGURA 6- ESTRUTURA DO GENE *MBL2*



FONTE: Adaptado de Dommet, Klein e Turner (2006)

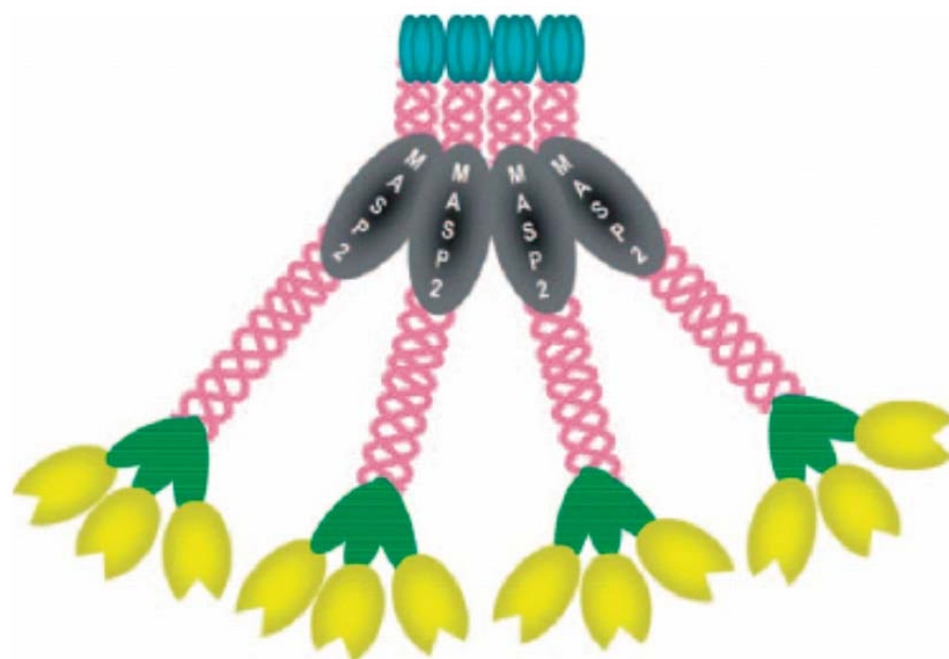
O CRD liga-se a um íon cálcio capaz de associar-se a grupos 3- e 4-hidroxil de determinados açúcares como N-acetil D-glucosamina, manose, N-acetil-

manosamina, fucose e glicose, encontrados na superfície de muitos microrganismos. Na região similar ao colágeno, as três cadeias peptídicas interagem formando uma tripla-hélice clássica típica de colágeno. Na região do pescoço, cada cadeia adota uma estrutura espiralada de encaixe. A região N-terminal, rica em cisteína, é importante para a efetiva oligomerização através de pontes de dissulfeto intercadeia (TURNER, 2003; FUJITA, MATSUSHITA e ENDO 2004).

O padrão repetitivo dos grupos de açúcares presentes na superfície dos microrganismos constitui alvos ideais para interações com MBL. Os três domínios de lectina agrupados dentro de cada subunidade oferecem condições de ligação com uma constante de distância de 45Å. A afinidade de cada interação açúcar-lectina é de somente de 10^3 M, mas o fato de a proteína ligar-se a múltiplos sítios simultaneamente assegura uma alta avidéz funcional de ligação.

Foram descritos vários polímeros de MBL, desde dímeros até hexâmeros. Há um predomínio de oligômeros pequenos (trímeros, dímeros ou tetrâmeros), embora os multímeros ativem de forma mais eficaz o complemento (TURNER, 2003; KILPATRICK, 2002a), figura 7.

FIGURA 7 - TETRÂMERO DE SUBUNIDADE ESTRUTURAL DE MBL HUMANA



FONTE: Dommet, Klein e Turner (2006)

3.2.5 Estrutura Genética da MBL

O gene da MBL foi clonado e seqüenciado independentemente em 1989 por dois grupos diferentes de pesquisadores (TAYLOR et al., 1989; SASTRY et al., 1989). Embora tenham sido descritos dois genes funcionais da MBL em roedores, somente o gene *MBL2* codifica um produto protéico em humanos, sendo o gene *MBL1p1* um pseudogene. O gene que codifica uma proteína funcional está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10 q11.2-q21).

A região codificadora do gene *MBL2* compreende quatro exons, interrompidos por três introns. O exon 1 codifica a região N-terminal e parte da região similar ao colágeno rica em glicina, responsável pela formação da tripla-hélice das estruturas colagenosas. O exon 2 codifica o restante da região similar ao colágeno e o exon 3 codifica a região do pescoço. O exon 4 codifica o domínio de reconhecimento dos carboidratos. Demonstrou-se que o gene *MBL2* contém um exon extra, chamado exon 0 e situado antes do exon 1, que não é traduzido mas que também pode participar do início da transcrição, embora em proporção menor que o exon 1 (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006).

A região promotora do gene *MBL2* contém vários elementos regulatórios, reconhecidos por proteínas de fase aguda, que afetam a transcrição da proteína. (GARRED et al., 2003; DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

3.2.6 Polimorfismo da MBL e suas Conseqüências Biológicas

Diferentes variantes têm sido descritas no gene da MBL. Estas podem acarretar alterações na atividade funcional e polimerização da proteína e variações na concentração plasmática, em especial sua redução, o que pode resultar em distúrbios imunes diversos (MADSEN et al., 1998; BERNIG et al., 2005).

Três polimorfismos nos códons 52, 54 e 57 do exon 1 foram identificados e denominados alelos *D*, *B* e *C*, respectivamente, codificando proteínas alteradas estru-

turalmente na região similar ao colágeno (SUMIYA et al., 1991; LIPSCOMBE et al., 1992; MADSEN, GARRED e KURTZHALS, 1994). figura 6.

As variantes *B* e *C* determinam a troca de uma guanina por adenina (GGC para GAC e GGA para GAA) nos nucleotídeos 230 e 239, respectivamente. Ocorre mudança na codificação da glicina por ácido aspártico no códon 54 e da glicina por ácido glutâmico no códon 57, respectivamente. Já na variante *D* ocorre a troca de uma citosina por uma timina (CGT para TGT) no nucleotídeo 223, levando à substituição de arginina por cisteína no códon 52. Estas substituições nos aminoácidos afetam a estrutura terciária da região colagenosa protéica, gerando defeitos na polimerização da molécula com redução na concentração sérica dos multímeros da proteína, em especial das variantes *B* e *C*, e incapacidade de ativação do sistema de complemento (STEFFENSEN et al., 2000; MADSEN, GARRED e KURTZHALS, 1994; PETERSEN, THIEL e JENSENIUS, 2001). Por convenção, a presença de qualquer uma destas mutações, *B*, *C* ou *D* é representada pela letra "O" e o alelo normal para o exon 1 é denominado de "A" (TERAI et al., 2003), figura 6.

Demonstrou-se que indivíduos homozigotos AA têm os níveis mais altos de MBL multimérica, já heterozigotos A/O têm níveis intermediários e os homozigotos OO, concentrações de MBL multimérica extremamente baixas (WORTHLEY, BARDY e MULLIGHAN, 2005). Em 1992, Garred et al. avaliaram 1.183 indivíduos e não conseguiram detectar multímeros de MBL sérica circulante em homozigotos para as mutações estruturais, embora estes estejam presentes em níveis muito baixos nos heterozigotos. Indivíduos heterozigotos A/O têm somente 1/8 da probabilidade de selecionar três cadeias peptídicas normais durante a biossíntese, pois somente um em 2x2x2 (um em oito) produtos oligoméricos dos indivíduos heterozigotos poderia ser normal (TURNER, 1996).

Na região promotora do gene da MBL, descreveram-se vários polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) associados a diferentes concentrações plasmáticas da MBL, embora de forma menos expressiva que as variantes do exon 1 (MADSEN et al., 1995 e 1998).

Duas mutações de ponto podem ser encontradas na região reguladora a 5' *H/L* (posição -550) e *Y/X* (posição -221) e uma na região não traduzida a 5' do gene da MBL, *P/Q* (posição+4). As variantes *H/L* e *X/Y* correspondem à substituição de uma guanina por citosina e *P/Q* à troca de uma citosina por uma timina (MADSEN et al., 1995). O alelo Q ocorre em desequilíbrio de ligação absoluto com três outros SNPs e uma deleção de 6 pb no promotor, figura 6.

Entre as mutações da região promotora, o efeito do alelo *X* é muitas vezes quantitativamente comparável à mutação estrutural do gene. A determinação do polimorfismo *Y/X* é, portanto, importante para uma leitura funcional do genótipo. Já a mutação *H*(alto) / *L*(baixo) está associada a uma variação bem mais modesta na concentração sérica da MBL (MADSEN et al., 1998), figura 6.

Os quatro haplótipos mais comumente encontrados a partir destes alelos polimorfos da região promotora são *HYP*, *LYP*, *LXP* e *LYQ*. Entre estes, o *HYP* está associado à concentração sérica normal ou mais elevada de MBL, enquanto o *LXP* está associado a valores mais baixos da proteína sérica. Este fato representa um sistema genético com efeito aditivo dos haplótipos: por exemplo, um haplótipo *LXP* em homozigose muitas vezes diminui a expressão basal de MBL de maneira tão efetiva quanto uma variante estrutural do exon 1 (MADSEN et al., 1995 e 1998). A variante *X* somente é encontrada formando o haplótipo *XA* (MADSEN et al., 1998).

As mutações possíveis de serem encontradas ocorrem em uma frequência variável em diferentes grupos étnicos (MADSEN et al., 1995; BERNIG et al., 2005). Em relação às mutações estruturais, observa-se que:

- a) O alelo *A* é o mais comum, com uma frequência em torno de 50% em diferentes populações estudadas, podendo chegar a 99,3% em aborígenes australianos (TURNER et al., 2000);
- b) O alelo *B* tem frequência aproximada de 15% em populações euro-asiáticas (MADSEN et al., 1995; GARRED et al., 1992) 45% em sul-ameríndios e 3% em africanos e populações da Oceania (MADSEN et al., 1998).

- c) O alelo *C* tem frequência de 25% em africanos ao sul do Saara, sendo incomum em europeus, orientais e ameríndios (LIPSCOMBE et al., 1992; MADSEN et al., 1995; GARRED et al., 1992).
- d) O alelo *D* tem frequência de até 10% em populações européias e de até 5% em populações africanas (TURNER, 1996).

A possibilidade da reposição de MBL vem sendo avaliada e poderá ter no futuro um papel importante no tratamento de pacientes com deficiências de MBL. Estudos com MBL purificada ou recombinante têm mostrado resultados promissores (VALDIMARSSON et al., 1998; JENSENIUS et al., 2003; THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006).

3.2.7 Relevância Clínica das Variantes Genéticas da MBL

Associação entre variantes de *MBL2* e infecções foi demonstrada por meio de muitos estudos (GARRED et al., 1995; SUMMERFIELD et al., 1997; KOCH et al., 2001). Deve-se levar em conta, entretanto, que grande parte da população geral apresenta níveis baixos ou elevados de MBL, sendo saudável (DAHL et al., 2004).

A concentração da MBL pode influenciar tanto na suscetibilidade a doenças quanto no curso delas, podendo, assim, ter um valor prognóstico das doenças associadas (KILPATRICK, 2002b).

A deficiência da MBL pode estar relacionada à maior suscetibilidade a doenças infecciosas, em especial a patógenos extracelulares (SUMMERFIELD et al., 1997), principalmente os causadores de infecção aguda do trato respiratório na infância (KOCH et al., 2001). Contudo, a deficiência da MBL pode conferir proteção contra certos parasitas intracelulares como a *Leishmania spp*, que depende da ativação do sistema do complemento para penetrar na célula (SANTOS et al., 2001) e o *Mycobacterium leprae*, causador da hanseníase (DORNELLES, PEREIRA-FERRARI e MESSIAS-REASON, 2006; MESSIAS-REASON et al., 2007).

Por outro lado, concentrações altas de MBL também podem, sob certas condições, acentuar o dano tecidual resultante da ativação indesejada do complemento (GARRED, 1992; GARRED et al., 1994). Esta situação foi demonstrada em um estudo paranaense, em que foram observados níveis elevados de MBL em pacientes com comprometimento cardíaco por doença reumática (SCHAFRANSKI et al., 2004).

O papel da MBL em doenças virais tem atraído a atenção de vários pesquisadores. Em relação ao vírus HIV, observou-se suscetibilidade aumentada para infecção em pacientes com deficiência de MBL. No entanto, resultados conflitantes são encontrados em relação à progressão da doença (PROHASZKA et al., 1997; SENALDI et al., 1995; AMOROSO et al., 1999; MAAS et al., 1998; ZEN, 2005).

Estudos da MBL em pacientes com hepatites virais ainda apresentam muitas indefinições, embora pareça haver um consenso quanto ao papel modulador desta proteína na evolução clínica dos pacientes (TURNER, 2003). No caso do vírus da hepatite B, relatou-se a associação entre a variante *B* do gene da *MBL* com a cirrose sintomática ou com a peritonite bacteriana espontânea em pacientes asiáticos (YUEN et al., 1999) e maior prevalência desta mesma mutação em pacientes que não sobreviveram à hepatite B fulminante (HOKOZAKI et al., 2002). Em um estudo mais recente, Thio et al. (2005) concluíram que a MBL funcional tem um papel central na patogênese da hepatite B aguda. Outros autores, no entanto, analisando pacientes alemães, africanos e coreanos, não encontraram a associação da MBL com hepatite B (HOHLER et al., 1998; BELLAMY et al., 1988; CHEONG, CHO e LIM, 2005).

3.3 MBL EM PACIENTES COM VHC

Até o momento, sete estudos foram publicados sobre o papel da MBL em pacientes com VHC.

Em 1998, Matsushita et al., avaliaram 93 pacientes japoneses com VHC, submetidos a tratamento para hepatite C com uso isolado de IFN α e 218 controles saudáveis. Foram pesquisadas três mutações *B*, *C* e *D* no exon 1 do gene *MBL2*,

tendo-se identificado somente o alelo *B* e uma taxa de homozigose menor e estatisticamente significativa nos pacientes com resposta sustentada (RS) ao tratamento, do que nos sem resposta (NR) e nos controles (2,2%, 14,6% e 10,6%, respectivamente $p < 0,05$). Os autores sugeriram que o alelo *B* poderia prever baixa resposta a terapia com interferon (Matsushita et al., 1998a). No mesmo ano, outro artigo de Matsushita et al., (1998b), mais abrangente, realizou uma análise de 159 pacientes japoneses com hepatite C crônica confirmada por histologia hepática, submetidos ao mesmo tratamento referido no estudo anterior e um grupo de 218 indivíduos controles. Neste estudo, além da avaliação das mutações no exon 1, também foram pesquisadas as variantes *H/L*, *X/Y* e *P/Q* da região promotora e da região 5' do gene *MBL2*. Os autores também avaliaram a concentração circulante de MBL em 75 amostras. Observou-se menor frequência de um grupo de variantes por eles designado "Tipo XB" (contendo *LXPA* ou *LYPB* em homozigose ou heterozigose) em pacientes com RS, do que nos NR ao tratamento (38,5% vs 60,7% $p = 0,008$) e nos controles sadios (57,3% $p = 0,014$). O "tipo XB" ainda apresentou menor concentração sérica de MBL do que o "Tipo YA" (com *Y* ou *A* em homozigose). Os autores sugerem um papel imunológico importante da MBL na eliminação do VHC durante o tratamento com IFN α , e que a determinação dos genótipos *MBL2* poderia ser útil na seleção de pacientes com hepatite C a serem tratados com IFN α .

Em 1999, Yuen et al. avaliaram a concentração e o polimorfismo do exon1 do gene *MBL2* em 44 pacientes chineses com hepatite C crônica e 117 casos controles e não encontraram diferença significativa entre a taxa de polimorfismo exon1 e da concentração de MBL quando comparado com o grupo controle.

Sasaki et al. (2000) avaliaram a presença das variantes *B*, *C* e *D* do gene *MBL2* e a concentração sérica de MBL, em 53 pacientes japoneses com anti-VHC positivo e 50 controles. Os pacientes foram divididos de acordo com critérios clínicos e laboratoriais nos seguintes grupos: hepatite crônica inativa (CHI), casos assintomáticos, com diagnóstico feito ao acaso, transaminases normais e função sintética do fígado normal; hepatite crônica ativa (CAH), casos com histórico de elevação

de transaminases, sem cirrose hepática de acordo com índices bioquímicos ou por tomografia computadorizada e cirrose hepática (LC), pacientes com índices bioquímicos alterados e com alterações sugestivas de hipertensão portal por meio de tomografia computadorizada. Os autores identificaram a presença de polimorfismo somente no alelo B, como nos demais estudos japoneses. Não foi encontrada uma diferença significativa entre as frequências genótípicas de *MBL2* em pacientes e controles. Todos os pacientes com homozigose ou heterozigose para o alelo B tinham formas mais graves da doença, ou seja, CAH ou LC e níveis mais baixos de MBL, no entanto, quando pacientes do mesmo genótipo foram comparados, não foi encontrada uma relação significativa entre a concentração sérica da MBL e o nível de comprometimento hepático.

Em 2003, Kilpatrick et al. analisaram especificamente a concentração da MBL em 180 pacientes escoceses com VHC e comparou com grupo de 566 doadores de sangue. Os autores observaram níveis de MBL significativamente mais elevados em pacientes com hepatite C do que no grupo controle e não encontraram associação entre os diferentes níveis de concentração da MBL e tipo de lesão hepática, progressão da doença ou grau de hepatite, bem como resultado ao tratamento com IFN α ou IFN α e RBV. Os autores sugerem que a concentração baixa de MBL não teria relação com maior suscetibilidade à infecção, ou associação com a evolução da doença, bem como relação com a resposta ao tratamento do VHC.

No ano de 2007 foram publicados dois estudos. Um desses trabalhos foi realizado com 111 pacientes brasileiros, do Nordeste do país, com hepatite C, por Segat et al. Estes autores avaliaram o polimorfismo do exon 1 de *MBL2* na população referida e os compararam com 165 controles saudáveis. Observaram que a frequência do alelo O foi significativamente maior no grupo de pacientes com VHC do que nos controles (34% vs 20%, $p < 0,01$, respectivamente, OR = 2,1; CI 1,41-3,19). A frequência dos genótipos também foi diferente de forma significativa entre os pacientes e controles, os genótipos OO e AO estiveram com uma frequência de 15% e 37%, respectivamente, enquanto nos controles foram observados em 6% e 27%,

respectivamente $p < 0,01$. A resposta na 12.^a semana de tratamento com IFN α peg. e RBV também foi avaliada, mas não se observou diferença significativa nos dois grupos analisados. Os autores sugerem que a MBL teria uma ação protetora nos primeiros estágios da infecção pelo VHC, visto que encontraram uma frequência mais alta de alelos normais na população controle do que na dos pacientes com VHC, mas que, após a instalação da infecção pelo VHC, a MBL teria um papel prejudicial na evolução da doença.

O segundo estudo, publicado em 2007, foi realizado por Somi et al.; os autores avaliaram a presença de polimorfismos na região promotora e exon 1 do gene *MBL2* em 100 pacientes iranianos com hepatite C e 100 doadores de sangue sadios. Observaram que o genótipo XA/O do gene *MBL2* foi significativamente mais freqüente entre os pacientes com VHC do que no grupo controle ($p = 0,0004$, OR: 2,90). Os autores sugerem que a MBL poderia ser um dos fatores que influenciariam a evolução da hepatite C.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Características Gerais dos Pacientes

Foram selecionados para esta pesquisa 102 pacientes entre 108 casos avaliados com hepatite C crônica. Seis pacientes foram excluídos do trabalho em função do extravio da amostra sanguínea, da revisão do laudo histológico não ter confirmado presença de critérios de inclusão ao estudo ou divergência entre os laudos histológicos quando confrontados por dois patologistas. Sessenta e cinco pacientes (63,7%) eram do sexo masculino e 37 (36,3%) do feminino, com média de idade de $51 \pm 9,5$ anos (tabela 1).

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS GRUPOS EM ESTUDO

VARIÁVEIS	PACIENTES (n = 102)		CONTROLES (n = 102)		TOTAL (n = 204)		VALOR DE p
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
Sexo							(1)0,884
Masculino	65	63,7	65	63,7	130	63,7	
Feminino	37	36,3	37	36,3	74	36,3	
Grupo Étnico							-
Branco	102	100,0	102	100,0	204	100,0	
Faixa Etária (anos)							(1)0,916
Até 30	02	2,0	02	2,0	04	2,0	
31 a 40	12	11,8	13	12,7	25	12,2	
41 a 50	40	39,2	42	41,2	82	40,2	
51 a 60	30	29,4	32	31,4	62	30,4	
61 e mais	18	17,6	13	12,7	31	15,2	
Média de idade \pm desvio padrão	51,0	$\pm 9,5$	49,6	$\pm 9,0$	50,3	$\pm 9,3$	(2)0,281
Mínima e máxima	28,4	69,6	28,5	72,3	28,4	72,3	

(1) Qui-Quadrado.

(2) t de Student.

Todos os pacientes tinham origem euro-brasileira caracterizada pelo fenótipo da cor branca da pele e a procedência do estado do Paraná.

Os casos foram selecionados dentre os pacientes atendidos no período 2003 até 2005, no ambulatório de hepatite viral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, na cidade de Curitiba.

Todos os pacientes que participaram deste estudo faziam acompanhamento ambulatorial devido à hepatite C e já haviam apresentado elevação de transaminases, em pelo menos duas dosagens, aumento este de 1,5 x ou mais o limite superior de normalidade do exame, durante um período de pelo menos seis meses. Por este motivo, todos os pacientes já haviam feito biópsia hepática e recebido, a seguir, indicação de tratamento medicamentoso, antes do início deste estudo. Nenhum paciente apresentava sinais de insuficiência hepática. Em 95 (93%) pacientes avaliou-se o genótipo do VHC, em sete casos o genótipo do VHC não foi pesquisado por indisponibilidade do teste no período de atendimento dos pacientes.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo 1).

4.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os seguintes critérios de inclusão e exclusão foram determinados para seleção dos pacientes deste estudo:

Critérios de inclusão:

1. idade superior a 18 anos;
2. concordância em participar do estudo e de assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE);
3. positividade ao teste sorológico anti-VHC em duas amostras sanguíneas e na pesquisa do RNA viral;
4. fibrose hepática grau dois ou mais segundo a classificação Metavir e disponibilidade do fragmento hepático para revisão.

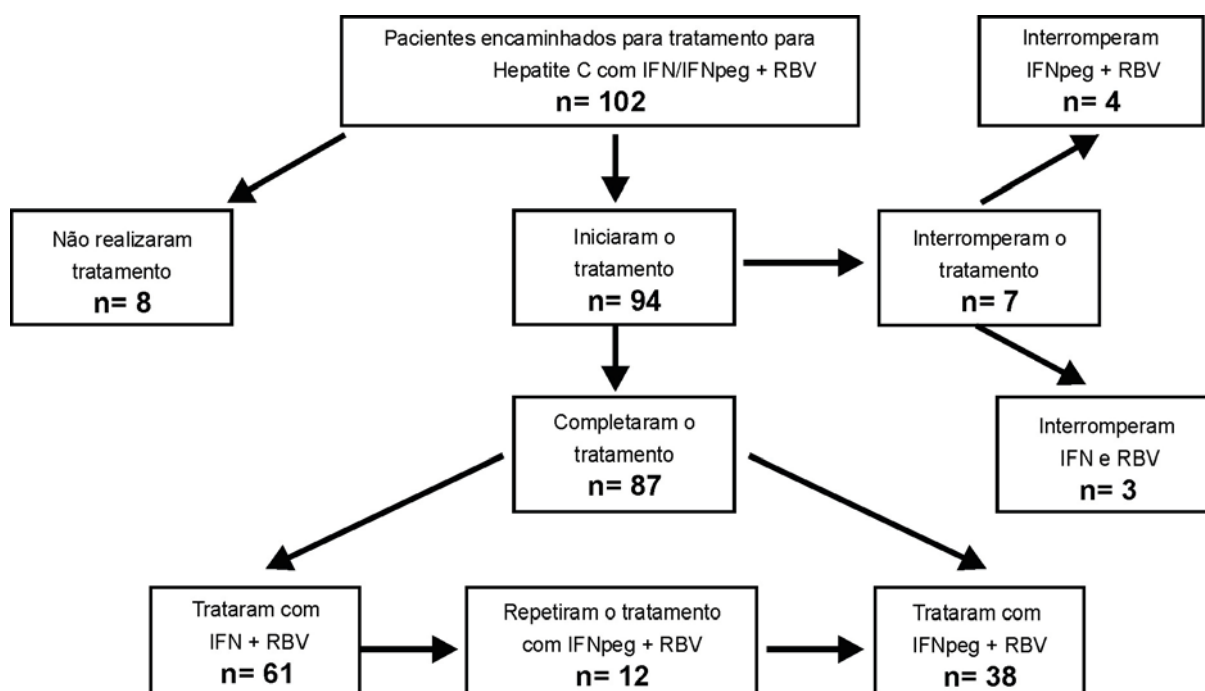
5. ausência de histórico de abuso de álcool (acima de 20g para a mulher e 40g para o homem);
6. ausência de co-infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) ou de infecção presente ou passada com o vírus da hepatite B (VHB);
7. ausência de doença hepática ou sistêmica com repercussão hepática e índice de massa corpórea (IMC) menor do que 30 kg/m².

Critérios de Exclusão:

1. Não concordância em permanecer no estudo;
2. Não disponibilidade de amostra sangüínea para genotipagem do gene *MBL2*;
3. Revisão de laudo histológico demonstrando fibrose hepática com grau inferior a dois, de acordo com a classificação Metavir;
4. Não concordância dos laudos histológicos realizados por dois patologistas.

4.1.3 Tratamento dos Pacientes com VHC com Interferon alfa (IFN α) ou Interferon alfa Peguilado (IFN α peg) e Ribavirina (RBV)

Dentre os 102 pacientes analisados, um total de 94 (92,1%) iniciaram o tratamento medicamentoso para hepatite C. Oito pacientes (7,8%) não foram tratados devido à piora da hepatopatia em quatro casos e desistência ou abandono do acompanhamento médico nos demais. Entre os 94 casos encaminhados ao tratamento, sete não completaram o tratamento até o final devido aos efeitos colaterais como plaquetopenia, neutropenia e (ou) anemia. Portanto, 87 pacientes completaram o tratamento, figura 8.

FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO TRATAMENTO REALIZADO NOS PACIENTES COM HEPATITE C COM IFN α peg. E RBV

Entre os pacientes que completaram o tratamento, 61 casos usaram interferon alfa 2a ou 2b (IFN α), na dose de 3 milhões de unidades, três vezes por semana, via subcutânea (SC), associados a 1000mg ou 1250mg de ribavirina, via oral (VO), de acordo com o peso inferior ou superior a 75kg. Trinta e oito pacientes foram tratados com interferon peguilado alfa 2a ou 2b (IFN α peg) na dose de 180 μ g/semana ou 1,5 μ g/kg/semana, via SC, associado à ribavirina, VO, na mesma dose acima descrita. Dentre esses, 12 casos já haviam realizado tratamento prévio com interferon e ribavirina.

O critério de indicação de tratamento adotado foi o do Protocolo de Tratamento do Ministério da Saúde de 2002, sendo que grande parte dos pacientes recebeu a medicação do governo federal.

4.1.4 Características Gerais do Grupo Controle

O grupo controle foi composto por 102 doadores de sangue de origem euro-brasileira, procedentes do Hemobanco do Hospital de Clínicas da UFPR e do Hemocentro, banco de sangue privado, ambos em Curitiba - Paraná, que assinaram

o TCLE para participar do estudo e que tinham testes sorológicos negativos para anti-VHC, anti-HBc total e anti-HIV1 e 2. Os controles foram pareados por sexo, idade e grupo étnico com os pacientes incluídos no estudo. Todos os indivíduos controles foram avaliados para a presença de polimorfismos no exon1 e região promotora do gene *MBL2* e em 53 (52%) indivíduos deste grupo, que tinham amostra sanguínea disponível, também foi feita a quantificação da MBL plasmática.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Pesquisa de anticorpos anti-VHB, anti-HIV, anti-VHC, RNA do VHC e genotipagem do VHC

Para a detecção dos anticorpos anti-HBc total, utilizou-se a técnica de quimioluminescência amplificada (QMA), por meio do kit comercial *anti-Reagent Pack* (*Ortho Clinical Diagnostics*, Amersham, Bucks, United Kingdom). Também usou-se a técnica imunoenzimática, ensaio imunoenzimático usando micropartículas (MEIA), com o kit comercial *Abbott AxSYM system* (*Abbott Diagnostics Division*, Wiesbaden, Germany).

Para a detecção dos anticorpos anti-HIV, utilizou-se a técnica de QMA com o kit comercial *Anti-HIV 1+2 Reagent Pack* (*Ortho Clinical Diagnostics*, Amersham, Bucks, United Kingdom). Também usou-se a técnica de imunoensaio enzimático (EIA) com o kit comercial *MUREX HIV 1.2.0* (*Abbott Laboratories* Dartford, Kent, United Kingdom) e a técnica MEIA, com o kit comercial *Abbott AxSYM HIV Ag/Ab Combo* (*Abbott Laboratories* Dartford, Kent, United Kingdom).

Para a pesquisa de anticorpos anti-HCV usou-se a técnica QMA, por meio do kit comercial *Anti-HCV Reagent Pack* (*Ortho Clinical Diagnostics*, Amersham, Bucks, United Kingdom), ou a técnica MEIA, *Anti-HCV ABBOTT* (*Abbott Diagnostics Division*, Wiesbaden, Germany).

Todos esses exames foram realizados nos laboratórios de Sorologia do Hospital de Clínicas da UFPR ou nos Bancos de Sangue, Hemobanco e Hemocentro.

Para a pesquisa do RNA do VHC foi empregada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com transcrição reversa, por meio do teste *Amplicor® Hepatitis C Vírus – HVC – Test*, version 2.0 (Roche, Branchburg, NJ, United States of America).

A genotipagem do VHC foi realizada por meio do método *line probe assay* (LIPA), reverso, por tratar-se de um vírus RNA, utilizando o kit comercial *VERSANT™HCV Genotype Assay* (Bayer, Tarrytown, NY, United States of America).

Esses dois últimos exames foram realizados no laboratório Central do Estado (LACEN).

4.2.2 Avaliação da concentração de MBL

A concentração sérica da MBL foi quantificada utilizando-se kits comerciais através de técnica EIA (ELISA for Human MBL, Staten Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca).

O teste foi realizado em microplacas adsorvidas com anticorpo monoclonal dirigido contra o domínio de carboidrato da MBL. As amostras de soro dos pacientes, dos controles sadios e dos soros de controle interno da técnica foram previamente diluídas a 1/100 com tampão de diluição. Adicionou-se, em cada cavidade de reação da microplaca, 100µl dos 8 calibradores com diferentes concentrações de MBL humana (0 a 40ng/ml) em duplicata na placa, 100µl do branco (tampão de diluição sem amostra), 100µl dos três soros controles internos da técnica (MBL abaixo de 100ng/ml, entre 100 e 1000ng/ml e acima de 1000ng/ml) e 100µl das diluições dos soros dos pacientes e dos controles sadios.

Foi realizada incubação por uma hora à temperatura ambiente, onde a MBL presente na amostra liga-se aos anticorpos monoclonais anti-MBL adsorvidos na placa. Foram realizadas quatro lavagens da placa, com o tampão de lavagem específico,

para a retirada do material em excesso. Adicionou-se à reação 100µl do anticorpo monoclonal biotilado anti-MBL e incubou-se novamente por uma hora à temperatura ambiente. Esse anticorpo de detecção liga-se aos oligômeros de MBL através de sítio de ligação com carboidratos que não estão sendo utilizados na ligação com o anticorpo primário. Realizaram-se quatro novas lavagens da placa, para a retirada dos anticorpos não ligados a MBL, e adicionou-se à reação 100µl de streptavidina conjugada com peroxidase do rábano silvestre (HRP). Ocorreu então a formação de um complexo com o anticorpo biotilado, ligado a MBL. Esta reação ocorreu em uma hora à temperatura ambiente. O conjugado que não se liga foi removido por quatro lavagens com tampão específico. Na seqüência, acrescentou-se o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) fornecedor de hidrogênio para a reação do substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com a peroxidase, o qual gera um produto colorido (azul). Esta reação foi realizada em 15 minutos e protegida da luz. Adicionou-se então 50µl de uma solução de bloqueio de reação, a qual, pela alteração da coloração (para amarelo) das soluções, indicou que a reação enzimática foi bloqueada.

A intensidade de cor foi aferida em um leitor de EIA a 450 nm (HEWLETT PACKARD, DESKJET 420, GERMANY). A densidade óptica (DO) obtida é proporcional à concentração de formas oligoméricas de MBL presentes nas amostras. A partir das leituras da densidade óptica dos calibradores, determinou-se um fator multiplicador para o cálculo dos valores séricos de MBL.

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração de MBL dos calibradores em ng/ml}}{\text{DO dos calibradores}}$$

$$\text{MBL (ng/ml)} = \text{Fator} \times \text{D.O. da amostra} \times \text{Diluição da amostra}$$

Esse teste foi realizado no laboratório de imunopatologia do Hospital de Clínicas.

4.2.3 Genotipagem dos polimorfismos *MBL2*

Para a realização da genotipagem, inicialmente o DNA genômico foi extraído de 200µl de sangue periférico anticoagulado com EDTA a partir das 204 amostras da população deste estudo, com o kit QIAamp (Qiagen - Hilden, Germany) para sangue, conforme as instruções do fabricante, (www1.qiagen.com/Products/).

A seguir foi realizada a técnica da PCR em tempo real com sondas de hibridização fluorescentes. Utilizou-se o Light Cycler™ Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), que é um fluorímetro de microvolume integrado a um termociclador. A PCR e análise da curva da temperatura de dissociação (Td) foram combinadas tendo por base o princípio da detecção da mutação por análise do ponto de fusão com sonda de hibridação com transferência de energia por ressonância fluorescente (FRET).

Utilizaram-se determinados iniciadores para exon1 e região promotora do gene *MBL2*, conforme quadro 1 e sondas fluorescentes para cada alelo pesquisado, bem como uma sonda de ancoragem para exon1 e três sondas de ancoragem para pesquisa dos alelos H/L, P/Q e X/Y, conforme quadro 2. Ao final foram avaliadas as temperaturas de dissociação específicas para cada alelo *MBL2* pesquisado (quadro 2).

QUADRO 1 - INICIADORES DO EXON1 E REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MBL2*

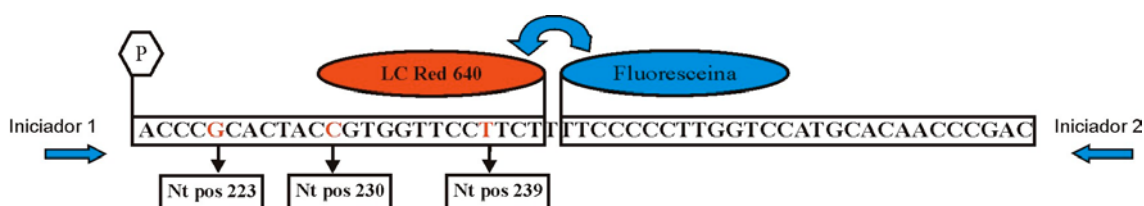
POSIÇÃO	INICIADORES
MBL Exon 1 m	5' – CATCAACGGCTTCCCAGGC – 3'
MBL Exon 1 j	5' – TGGGCTGGCAAGACAACCTATTAG – 3'
MBL Promotora m	5' – CCTGCCAGAAAGTAGAGAGG – 3'
MBL Promotor a j	5' – CCTCACCTTGGTGTGAGAAA – 3'

QUADRO 2 - SONDAS FLUORESCENTES, SONDAS DE ANCORAGEM E TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO DO EXON1 E REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MBL2*

POSIÇÃO	SONDAS		Td
MBL C	L c red 640	5' – TTCTTCCTTGGTGCCATCACGCCCA– 3'	72,9
MBL B	L c red 640	5' – TTCTCCCTTGGTGTCATCACGCCCA– 3'	64,2
MBL D	L c red 640	5' – TTCTCCCTTGGTGCCATCACACCCA– 3'	66,2
MBL A	L c red 640	5' – TTCTTCCTTGGTGCCATCACGCCCA– 3'	70,9
MBL Exon 1 âncora		5' – CAGCCCAACACGTACCTGGTTCCCCCT– 3' FLU	
MBL H		5' – TTTTAGACAGGCTTGCCTGGGT– 3' FLU	64,8
MBL L		5' – TTTTACACAGGCTTGCCTGGGT– 3' FLU	67,8
MBL H/L âncora	L c red 640	5' – AGCATTTTCTCTGGAAATTTCTTAC– 3'P	
MBL P		5' – CAGAGGGCATGCTCGGTAA–3' FLU	66,3
MBL Q		5' – CAGAGGGCATGCTTGGTAA– 3' FLU	57,3
MBL P/Q âncora	L c red 640	5 – ATGTGTTTACTTACTGAGATTAACCTTCCCTGAG– 3'P	
MBL X		5' – TCTCACTGCCACCGAAAGCAT– 3' FLU	67,6
MBL Y		5' – TCTCACTGCCACCGAAAGCAT– 3' FLU	58,5
MBL X/Y âncora	L c red 705	5' – TTTATAGTCTTCCAGCAGCAACGCCA – 3'P	

Na figura 9 um diagrama esquemático mostra as posições dos iniciadores e das sondas de hibridação para a amplificação e genotipagem da mutação do exon 1. Dessa forma, assim que ocorre o anelamento das duas sondas de hibridação na região interna da mesma fita em que ocorrerá o anelamento dos iniciadores, a sonda de ancoragem ativa a sonda sensora, complementar ao alelo C, e emitirá uma fluorescência indicadora da presença do alelo pesquisado.

FIGURA 9- POSIÇÕES DOS INICIADORES E DAS SONDAS DE HIBRIDAÇÃO PARA A AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO DO EXON 1



FONTE: Adaptada de Steffensen, Hoffmann e Varming (2003)

Condições para amplificação por PCR do exon 1:

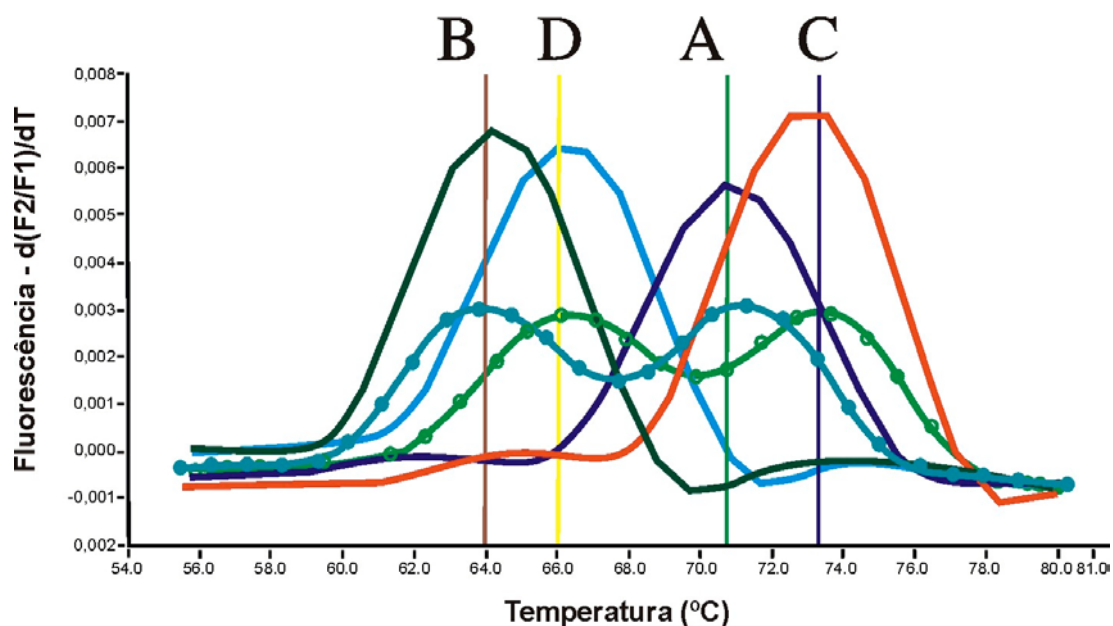
A análise das variantes do exon 1 foi realizada em um *LightCycler* (Roche Molecular Biochemicals). Empregou-se um volume total de 20µl, contendo 50ng de DNA, 0,5µM de cada um dos iniciadores não marcados, 0,4µM da sonda de ancoragem, 0,2µM da sonda de mutação e 2µl x 10 das sondas mestras de hibridação *Light-*

Cycler-DNA da Roche *Diagnostics* (cat. n.º 2015102). Este tampão contém nucleotídeos, *Thermus aquaticus* DNA polimerase e 10mM Mg^{2+} . A concentração final de Mg^{2+} na mistura foi ajustada para 3,5mM.

As condições do ciclador foram as seguintes: desnaturação da amostra de DNA por 1 ciclo a 95°C por 30s, amplificação do DNA alvo por 45 ciclos a 95°C por 5s, 60°C por 10 s, e 72°C por 9s. As taxas e transição de temperatura foram programadas a 20°C/s entre a desnaturação ao anelamento, 3°C/s do anelamento à extensão e 20°C/s da extensão à desnaturação.

Após a amplificação, uma análise da temperatura de dissociação foi realizada a 1 ciclo de 95°C por 5s e um ciclo de 50°C por 180s, cada uma com uma taxa de transição de temperatura de 20°C/s, ou seja, subindo 0,2°C/s para 85°C por 5s (figura 10).

FIGURA 10 - TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO DO EXON 1



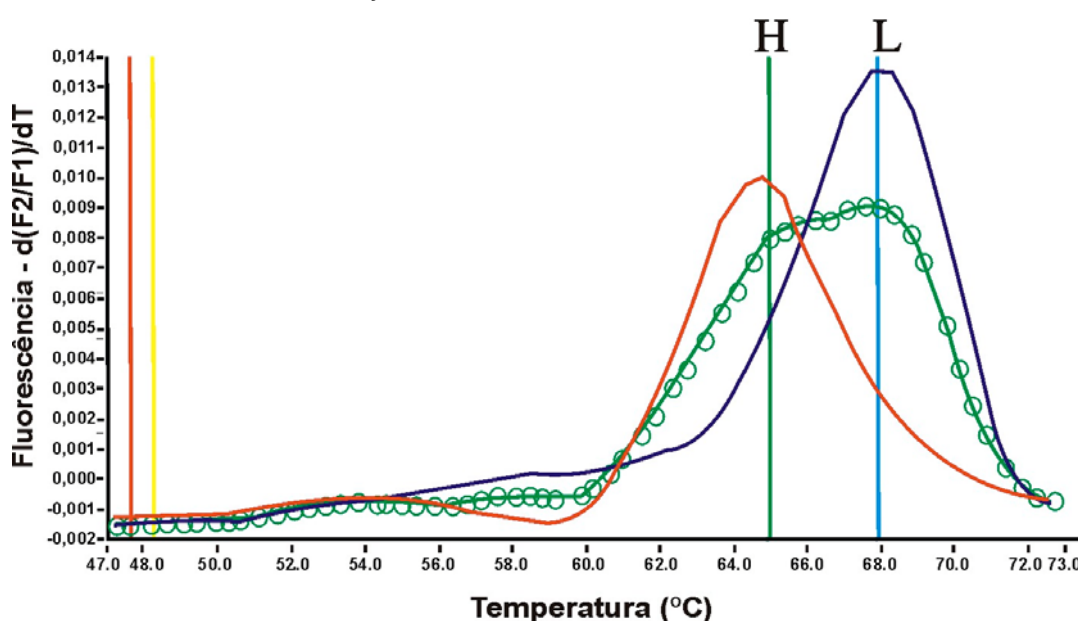
FONTE: Adaptada de Steffensen et al. (2003)

NOTA: As curvas de dissociação são mostradas para uma amostra em homozigose para o alelo B ($T_d = 64,2^\circ\text{C}$) (curva verde escura), uma amostra em homozigose para o alelo D ($T_d = 66,2^\circ\text{C}$) (curva azul turquesa), uma amostra em homozigose para o alelo A ($T_d = 70,9^\circ\text{C}$) (curva azul), uma amostra em homozigose para o alelo C ($T_d = 72,9^\circ\text{C}$) (curva vermelha).

Condições para amplificação por PCR da região promotora:

A amplificação foi realizada por meio do aparelho *LightCycler* (Roche Molecular Biochemicals). Para a genotipagem das variantes H/L, foi utilizado um volume total de 20µl, tendo 0,5µM de iniciadores não marcados, 0,4µM de sondas de detecção, 0,2µM de sondas de ancoragem e 50ng de DNA genômico. Utilizou-se o mesmo tampão de reação acima descrito. A concentração final de Mg^{2+} na reação de mistura foi ajustada para 4mM. Após uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 30s, a amplificação foi realizada usando 45 ciclos para a desnaturação (94°C por 0s), anelamento (57°C por 10s) e extensão (72°C por 20s). A fluorescência foi medida ao final do período de anelamento de cada ciclo para monitorar a amplificação. Após a amplificação estar completa, uma curva final de dissociação foi registrada por resfriamento da mistura para 50°C a 10°C/s, mantendo-a em 45°C por 3 minutos, e então lentamente aquecendo-a até 75°C a 0,2°C/s. A fluorescência foi mensurada de forma contínua durante o descenso lento da temperatura para monitorar a dissociação da sonda de detecção marcada com fluoresceína (figura 11).

FIGURA 11 - CURVA DE DISSOCIAÇÃO DAS VARIANTES H/L



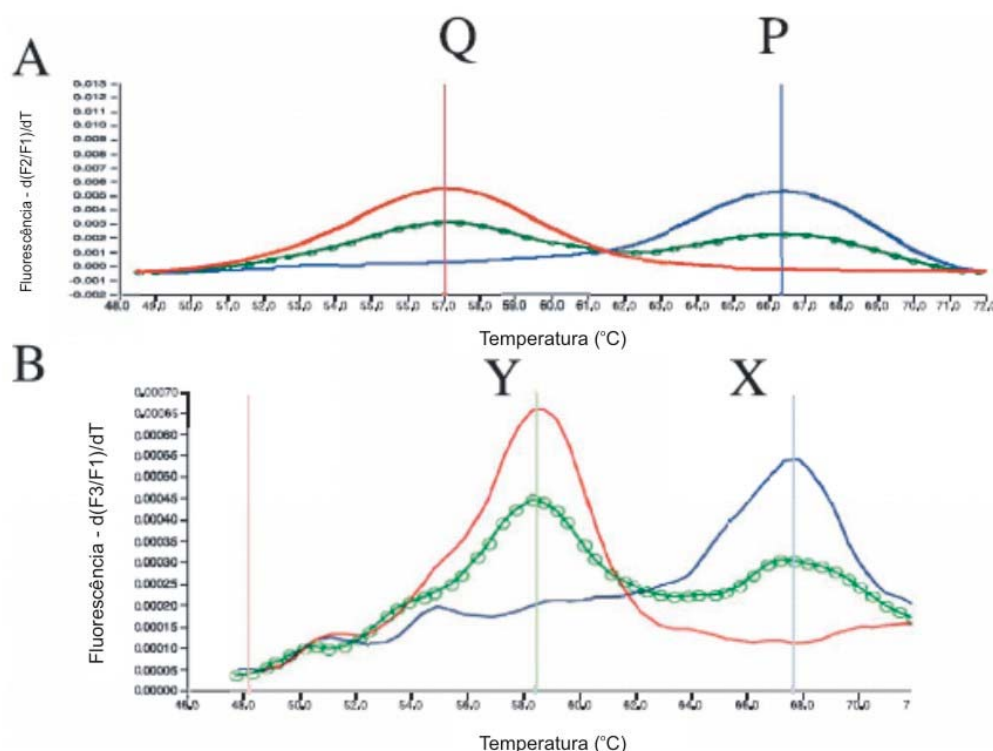
FONTE: Adaptada de Steffensen et al. (2003)

NOTA: Curvas de dissociação são mostradas para uma amostra em homozigose para o alelo L ($T_d=67,8^\circ\text{C}$) (curva azul), uma amostra em homozigose para o alelo H ($T_d=64,8^\circ\text{C}$) (curva vermelha) e uma amostra em heterozigose H/L (curva verde-escura).

Foi realizada detecção simultânea das variantes X/Y e do P/Q por dupla coloração nas mesmas condições para a genotipagem H/L, por meio de uma PCR multiplex contendo um iniciador não marcado e dois jogos de sondas marcadas por fluorescência. A amplificação foi realizada com volume de reação de 20 microl com 0,5 micro M para cada iniciador não marcado, 0,4 μ M de cada uma das sondas de detecção, 0,2 μ M de cada uma das sondas de ancoragem e 50ng de DNA genômico. Utilizou-se o mesmo tampão de reação empregado previamente, e a concentração final de Mg²⁺ da mistura foi ajustada para 4mM. Usando compensação por cor, utilizado para corrigir o hiperfluxo de sinal entre os canais 2 e 3, foi possível detectar tanto o polimorfismo X/Y quanto o polimorfismo P/Q no mesmo capilar. Os arquivos de compensação por cor foram gerados com o uso do equipamento para compensação de cor da Roche Diagnostics (cat. no. 2158850). Com a compensação da cor, as amostras foram genotipadas para ambas as mutações, nas quais a mutação P/Q foi detectada no canal F2 (o canal LC-Red 640) e a mutação X/Y foi detectada no canal F3 (o canal LC-red 705).

Se todas as três sondas de hibridização para a região promotora fossem usadas simultaneamente em uma reação de PCR, não seria possível obter genotipagem confiável, uma vez que haveria discriminação insuficiente entre os valores T_d individuais (figura 12).

FIGURA 12 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DAS VARIANTES P/Q E X/Y



FONTE: Adaptada de Steffensen et al. (2003)

NOTA: Genotipagem multiplex por coloração e T_d. O gráfico A mostra o derivativo negativo para a curva de dissociação para três genótipos detectados com uma sonda P específica. Uma homozigose para a amostra do alelo P (T_d=66,3°C) (curva azul), uma homozigose para a amostra do alelo Q (T_d=57,3°C) (curva vermelha) e heterozigose P/Q indicada pela curva verde. O gráfico B mostra o derivativo negativo das curvas de dissociação para três genótipos detectados com uma sonda X específica. Uma homozigose para a amostra do alelo X (T_d=67,6°C) (curva azul), homozigose para a amostra do alelo Y (T_d=58,5°C) (curva vermelha) e heterozigose para o X/Y (curva verde).

A genotipagem da MBL foi realizada no laboratório da Dr.^a Rudi Steffensen no Hospital Aalborg, Dinamarca.

4.2.4 Análise Histopatológica

Todos os pacientes foram submetidos à biópsia hepática por meio de punção percutânea, e o fragmento obtido foi avaliado pela coloração de Hematoxilina eosina e impregnação do retículo com sais de prata (reticulina) para avaliação do grau de fibrose. O critério adotado para graduação da fibrose foi o estabelecido pela classificação Metavir (BEDOSSA e POYNARD, 1996), que gradua a fibrose hepática entre 0 a 4, sendo F0: ausência de fibrose, F1: fibrose na região portal do parênquima

hepático sem septos, FII: fibrose portal com raros septos, F III: numerosos septos, sem cirrose e FIV: cirrose. Todos os laudos histológicos foram realizados e revisados por um único patologista e posteriormente foram confrontados com a avaliação de um segundo patologista, que não foi informado do diagnóstico prévio. Os casos com diagnósticos não concordantes foram excluídos do estudo.

4.2.5 Análise Estatística

As frequências genótípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados usando-se o método descrito por Guo e Thompson em 1992. A distribuição da frequência alélica dos pacientes e controles e de outras populações descendentes de europeus foram comparadas aplicando-se o teste exato de diferenciação de populações de Rousset e Raymond, 1995. Ambas análises foram realizadas usando-se o *software* ARLEQUIM versão 3.1 (SCHNEIDER, ROESSLI e EXCOFFIER, 2000) (Apêndice 1).

Associações possíveis entre os genótipos e alelos de *MBL2* e suscetibilidade ao VHC, evolução da doença e tratamento foram analisadas por teste de Qui-Quadrado com correção de Yates ou exato de Fisher, quando apropriado. O teste paramétrico "t de Student" e os não-paramétricos "Mann-Whitney" e Kruskal-Wallis foram usados para avaliações quantitativas. O *software* Primer of Biostatistics foi usado para comparação entre duas proporções e o teste Qui-Quadrado pelo *software* Epi-Info. Calculou-se a razão de chances (*odds ratio*) sempre que comparada a diferença relativa de uma variável entre dois grupos. O nível de significância adotado foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Toda população do estudo apresentou negatividade aos testes sorológicos anti-HIV e anti-HBc total. Todos os pacientes apresentavam positividade para os anticorpos anti-HCV na avaliação de duas amostras independentes de soro e presença do RNA do VHC através da técnica de PCR. Já no grupo controle todos indivíduos apresentavam negatividade ao teste anti-HCV no momento da sua inclusão no estudo.

5.1 HAPLÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES COM HEPATITE C E CONTROLES

Foram encontrados oito diferentes haplótipos *MBL2* nos pacientes e controles investigados. Observou-se o haplótipo raro *LYPD* em um indivíduo do grupo controle (sexo masculino, 52 anos). A frequência de cada haplótipo foi semelhante nos dois grupos de população estudados ($p=ns$). Os haplótipos mais frequentemente encontrados foram *HYP A*, *LXP A*, *LYQ A* e os menos frequentes foram *LYQ C* e *HYP D* em ambas populações analisadas. A frequência alélica da variante *B* foi de 14,2% ($n=29$), da variante *C* 2,9% ($n=6$) e da variante *D* 5% ($n=10$), (tabela 2).

5.2 GENÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES COM VHC E CONTROLES

Observaram-se, no total, 26 diferentes genótipos de *MBL2* nos pacientes e controles avaliados, sendo que a frequência de cada genótipo não foi significativamente diferente entre os grupos estudados ($p=ns$). Entre os pacientes foram observados 22 genótipos e nos controles 23 diferentes genótipos. Os genótipos *LYP B/LYP A*, *LYQ C/LYP A* e *HYP D/LYP A* só foram encontrados no grupo dos pacientes, enquanto os genótipos *LYQ C/LYP B*, *HYP D/LYP A*, *HYP D/LYP B* e *LYP A/LYP D* só estiveram presentes nos controles (tabela 3).

TABELA 2 - HAPLÓTIPOS DE *MBL2* EM PACIENTES COM VHC E CONTROLES

HAPLÓTIPOS <i>MBL2</i>	PACIENTES COM VHC		CONTROLES	
	N = 204	%	n = 204	%
HYPA	57	27,94	54	26,47
LYQA	37	18,14	43	21,08
LYPE	21	10,29	19	9,31
LXPA	44	21,57	43	21,08
LYPB	29	14,22	31	15,20
HYPD	10	4,90	10	4,90
LYQC	6	2,94	3	1,47
LYPD	0	0	1	0,49

TABELA 3 – GENÓTIPOS DE *MBL2* EM PACIENTES COM VHC E CONTROLES

GENÓTIPOS <i>MBL2</i>	PACIENTES COM VHC	CONTROLES
LYPB / LXPA	6 (5,88%)	9 (8,82%)
HYPA / LYQA	11 (10,78%)	13 (12,75%)
HYPA / HYPA	6 (5,88%)	9 (8,82%)
LXPA / HYPA	14 (13,73%)	8 (7,84%)
LXPA / LYPE	4 (3,92%)	4 (3,92%)
HYPD / LXPA	2 (1,96%)	2 (1,96%)
LXPA / LYQA	5 (4,90%)	8 (7,84%)
LYPE / HYPA	6 (5,88%)	5 (4,90%)
LYPB / LYQA	8 (7,84%)	4 (3,92%)
HYPA / LYPB	9 (8,82%)	8 (7,84%)
LYPE / LYPE	1 (0,98%)	2 (1,96%)
LYPB / LYPE	4 (3,92%)	0 (0%)
LXPA / LYQC	1 (0,98%)	1 (0,98%)
HYPD / HYPA	4 (3,92%)	1 (0,98%)
LYQA / LYPE	3 (2,94%)	3 (2,94%)
LYPB / LYPB	1 (0,98%)	4 (3,92%)
HYPD / HYPD	1 (0,98%)	2 (1,96%)
LXPA / LXPA	6 (5,88%)	6 (5,88%)
LYQC / LYQA	4 (3,92%)	0 (0%)
HYPD / LYPE	2 (1,96%)	0 (0%)
LYQA / LYQA	3 (2,94%)	7 (6,86%)
LYQC / HYPA	1 (0,98%)	1 (0,98%)
LYQC / LYPB	0 (0%)	1 (0,98%)
HYPD / LYQA	0 (0%)	2 (1,96%)
HYPD / LYPB	0 (0%)	1 (0,98%)
LYPE / LYPD	0 (0%)	1 (0,98%)
TOTAL	102	102

5.3 GENÓTIPOS *MBL2* E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES COM HEPATITE C E CONTROLES

Agruparam-se os genótipos em 6 diplótipos compostos pelas variantes X/Y da região promotora e A/O do exon 1, de acordo com sua influência sobre os níveis séricos de MBL, objetivando-se relacionar a concentração de MBL com os genótipos

de *MBL2*, ou seja, *YA/YA* e *XA/YA* relacionada com alta concentração *YA/YO* concentração intermediária e *XA/XA*, *XA/YO*, *YO/YO* com baixa concentração de MBL no plasma (BOLDT et al., 2006; MINCHINTON et al., 2002).

A frequência do genótipo *YA/YO* foi significativamente maior nos pacientes com VHC do que nos controles (32/102, 31,4% vs 17/102, 16,7%, $p=0,022$, OR 2,29, CI 95% 1,17- 4,46). Observou-se que os genótipos *YA/YA* e *XA/YA* foram os mais freqüentemente encontrados tanto no grupo de pacientes quanto nos controles. Já os genótipos *XA/XA*, *XA/YO* e *YO/YO* foram observados com menor freqüência em ambas as populações avaliadas. Os demais genótipos associados com maior ou menor expressão sérica de MBL não mostraram resultados estatisticamente significante entre pacientes e controles (tabela 4).

TABELA 4 - GENÓTIPOS *MBL2* E CONCENTRAÇÃO DE MBL EM PACIENTES COM VHC E CONTROLES

GENÓTIPO <i>MBL2</i>	PACIENTES COM VHC				CONTROLES			
	n1 = 102	%	n2 = 82	[MBL ng/ml]	n1 = 102	%	n2 = 50	[MBL ng/ml]
<i>YA / YA</i>	30	29,4	23	2413 (481-5594)	39	38,2	20	2093,5 (280-5023)
<i>XA / YA</i>	23	22,5	20	1579 (479-4059)	20	19,6	11	915 (513-2600)
<i>YA / YO</i>	32	31,4	26	370,5 (107-2713)	17	16,7	12	520 (97-3100)
<i>XA / XA</i>	6	5,9	6	423 (36-1388)	6	5,9	2	279 (195-363)
<i>XA / YO</i>	9	8,8	6	71,5 (11-835)	12	11,8	1	47
<i>YO / YO</i>	2	2	1	< 10	8	7,8	4	< 10

NOTA: As medianas dos níveis de MBL na admissão foram dadas, seguidas pelos limites de valores entre parênteses. Em negrito: diferença significativa ($p = 0,022$, OR 2,29, CI 95% 1,17- 4,46).

n1= número de indivíduos genotipados.

n2= número de indivíduos quantificados sorologicamente.

Não se observou diferença nos níveis circulantes de MBL entre os pacientes com hepatite C e os controles avaliados (média: 1,410/1,485ng/ml), quando avaliados independente dos genótipos *MBL2* (tabela 5).

TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DE MBL NOS GRUPOS DE ESTUDO

DADOS	N.º	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE $p^{(1)}$
TOTAL GERAL							
Pacientes	81	1 410,5	1 313,8	11,0	5 594,0	855,0	0,497
Controle	46	1 465,1	1 139,4	47,0	5 023,0	1 302,5	

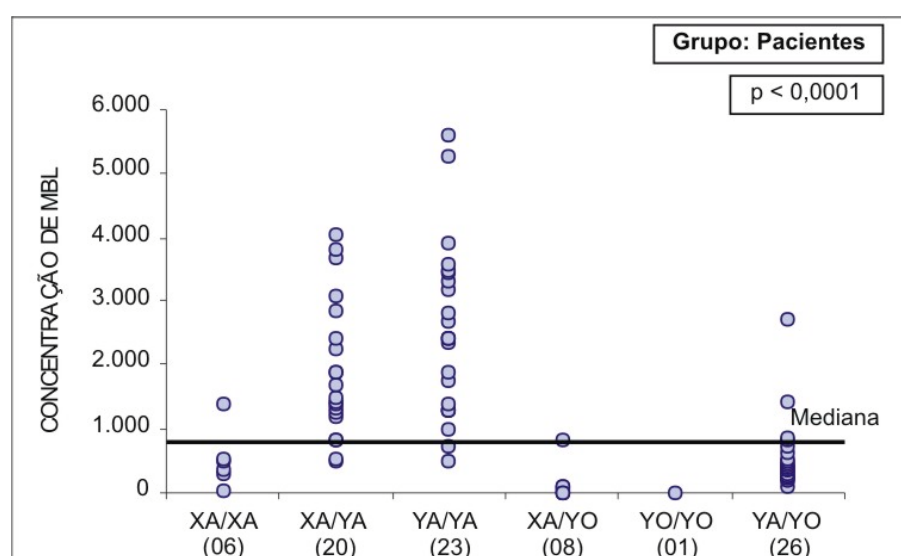
NOTA: Desvio padrão muito elevado recomenda-se utilizar a mediana.

(1) Mann-Whitney.

(2) Não estão incluídos no grupo de pacientes três casos com MBL <10 e sete no controle.

Ao comparar-se a concentração da MBL entre os genótipos XA/YA, YA/YA e YA/YO, observou-se concentração significativamente menor da proteína (mediana 370,5ng/ml) nos indivíduos com genótipo YA/YO quando comparados aos portadores de outros genótipos ($p < 0,0001$). Já o genótipo YA/YA apresentou a concentração de MBL mais elevada (mediana 2413ng/ml). O único caso com genótipo YO/YO (< 10 ng/ml) apresentou níveis séricos muito baixos de MBL. A concentração de MBL circulante variou significativamente entre os diferentes genótipos nos pacientes ($p < 0,0001$) e controles ($p = 0,004$) – figuras 13 e 14.

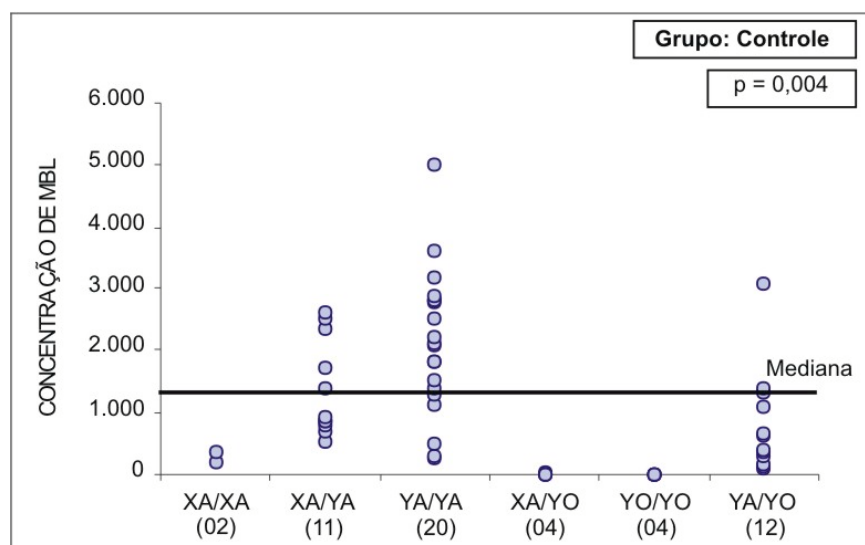
FIGURA 13 - GENÓTIPOS DE *MBL2* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL NOS PACIENTES COM HEPATITE C



NOTAS: 1. Valores expressos entre parênteses representa o número de indivíduos.
2. A análise estatística refere-se apenas à comparação entre os genótipos XA/YA, YA/YA e YA/YO (Teste de Kruskal-Wallis)

Essa mesma relação foi observada na avaliação dos controles com menor e a maior concentração sérica da MBL encontrada, respectivamente, nos indivíduos com genótipos YA/YO e YA/YA ($p = 0,004$), (figura 14).

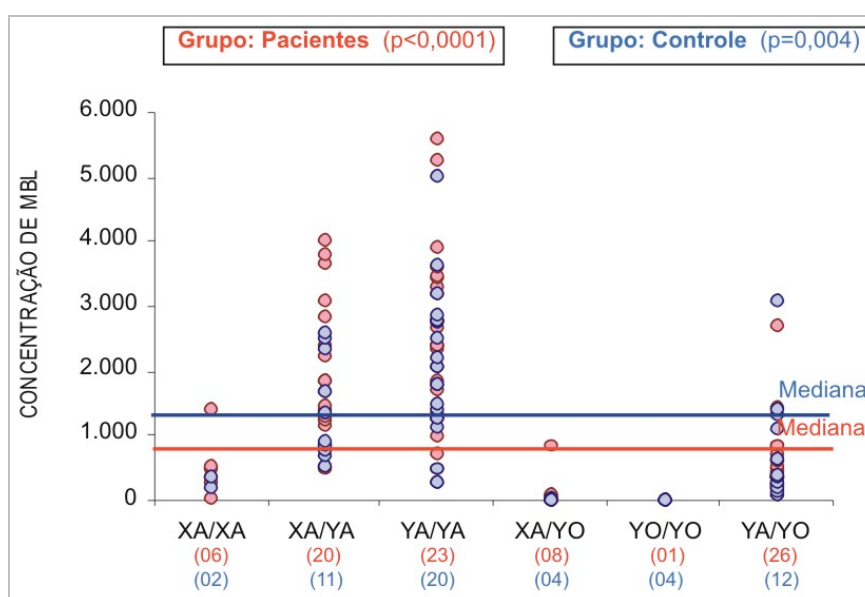
FIGURA 14 - GENÓTIPOS *MBL2* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE MBL NO GRUPO CONTROLE



NOTAS: 1. Valores expressos entre parênteses representa o número de indivíduos.
2. A análise estatística refere-se apenas à comparação entre os genótipos XA/YA, YA/YA e YA/YO (Teste de Kruskal-Wallis)

De maneira geral, o nível sérico de MBL encontrado esteve baixo quando os genótipos XA/XA e XA/YO estiveram presentes quer nos pacientes com VHC (494,5ng/ml), quer naqueles do grupo controle (mediana 326ng/ml) e muito baixos (<10ng/ml) sempre que o genótipo YO/YO foi observado. O genótipo YA/YO, por outro lado, se apresentou associado a níveis intermediários de MBL nos pacientes (mediana 370, 5ng/ml) e nos controles (mediana 520ng/ml) – figura 15 e tabela 4.

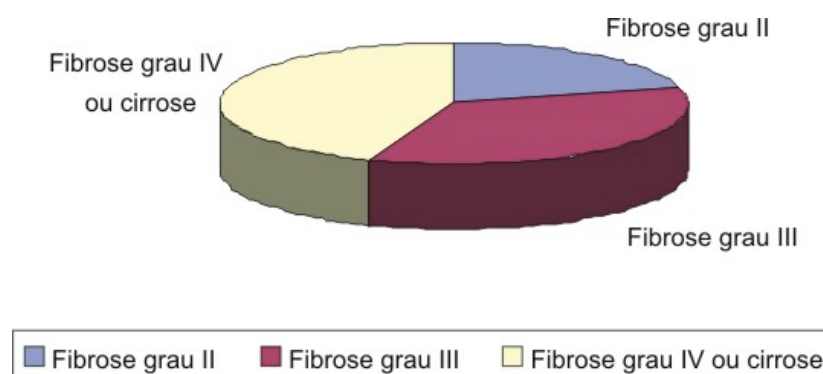
FIGURA 15 - GENÓTIPOS DE *MBL2* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE MBL NOS GRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES



5.4 ANÁLISE DA FIBROSE HEPÁTICA NOS PACIENTES

Entre os 102 casos analisados, 21 (20,6%) pacientes apresentaram fibrose grau II, 36 (35,3%) casos fibrose grau III e 45 (44,1%) pacientes fibrose grau IV (figura 16).

FIGURA 16 - GRAUS DE FIBROSE HEPÁTICA NOS PACIENTES COM HEPATITE C



5.4.1 Genótipos *MBL2* e Grau de Fibrose Hepática nos Pacientes

Observou-se que a frequência dos genótipos associados a níveis baixos de MBL (*XA/XA*, *XA/YO* e *YO/YO*) foi significativamente menor nos pacientes com fibrose hepática grau IV do que em pacientes com fibrose grau II (4/45, 8,9% vs 6/21, 28,6% $p=0,04$ OR=0,24 CI95%=0,06-0,99) e também quando relacionada ao grupo controle (4/45, 8,9% vs 26/102, 25,5%, $p=0,011$, OR=0,29, CI95%=0,09 – 0,87), (tabela 6). Já os genótipos associados com alta concentração sérica de MBL não apresentaram associação significativa com o grau de fibrose hepática.

O genótipo *YA/YO* associado a níveis intermediários de MBL sérica apresentou aumento não significante nos casos com fibrose hepática mais grave quando comparados a graus menos intensos de fibrose, ou seja, fibrose grau IV=17/45, (37,8%) vs fibrose grau II=4/21, (19,1%) e fibrose grau III=11/36, (30,6%) $p=0,07$) – tabela 6.

Entre os pacientes com fibrose hepática grau IV, observou-se uma tendência, não significativa, de maior prevalência do genótipo *YA/YO* (17/45, 37,8%)

quando comparados a todos os demais genótipos (28/45, 62,2%). Ainda nos casos com fibrose grau IV, houve uma elevada prevalência dos genótipos relacionados à alta concentração de MBL, ou seja, YA/YA, XA/YA (24/45, 53,3%), quando comparados entre os casos de média ou baixa prevalência (28/45, 37,8% e 4/45, 8,9% respectivamente). Nenhum paciente com fibrose grau IV foi portador do genótipo YO/YO (0/45), enquanto quatro casos (4/45, 8,9%) foram XA/XA e XA/YO (tabela 6).

TABELA 6 - GENÓTIPOS DE *MBL2* E GRAVIDADE DA FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATITE C

GENÓTIPOS <i>MBL2</i>	GRAU II		GRAU III		GRAU IV	
	n = 21	%	n = 36	%	n = 45	%
YA / YA	11	52,4	18	50,0	24	53,3
XA / YA	7	33,3	10	27,8	13	28,9
YA / YO	4	19,1	8	22,2	11	24,4
XA / YO	4	19,1	11	30,6	17	37,8
YO / YO	2	9,5	3	8,3	1	2,2
XA / XA	3	14,3	3	8,3	3	6,7
YO / YO	1	4,7	1	2,8	0	0
XA / XA						
XA / YO	6	28,6	7	19,4	4	8,9
YO / YO						

NOTA: Em negrito, diferença significativa ($p=0,04$, OR 0,24 CI 95% 0,06 – 0,99).

FIGURA 17 - RELAÇÃO ENTRE OS GRAUS DE FIBROSE HEPÁTICA E OS GENÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES COM HEPATITE C

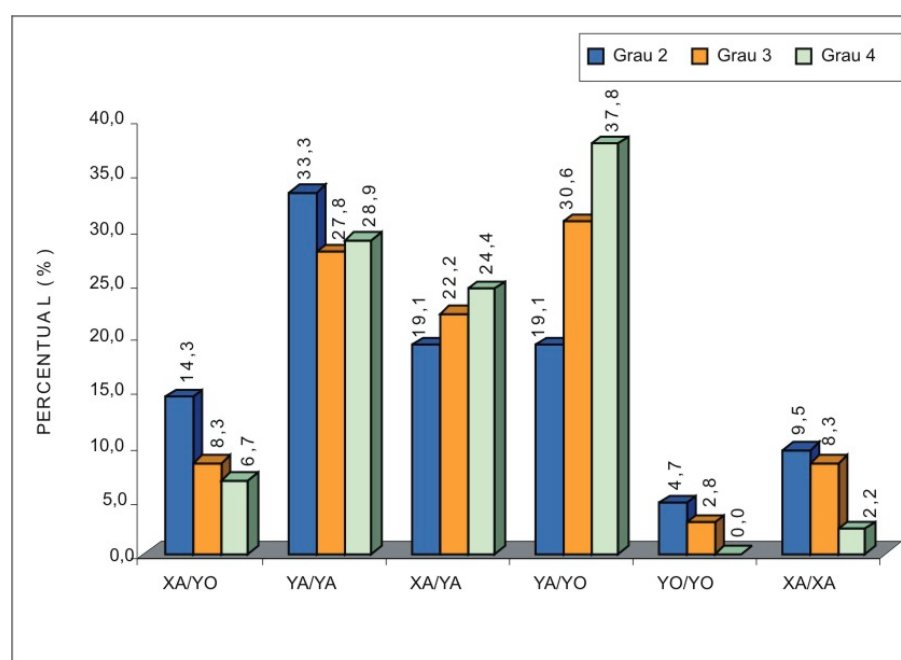
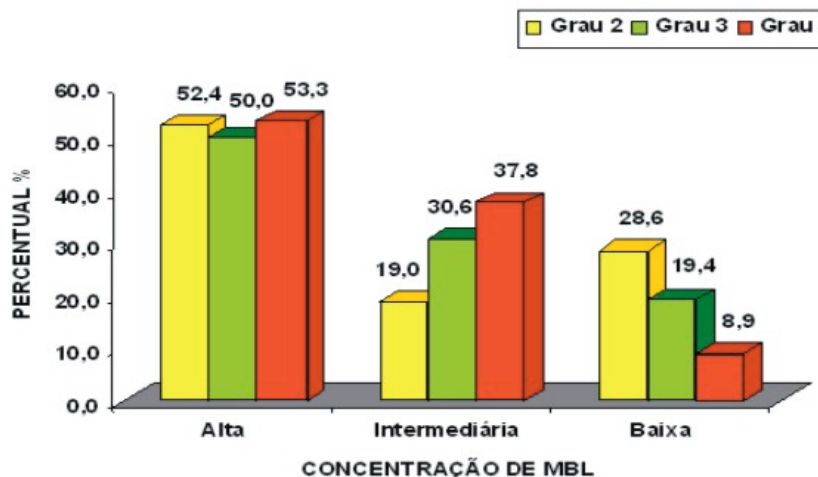


FIGURA 18 - RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS *MBL2* AGRUPADOS DE ACORDO COM A INFLUÊNCIA EXERCIDA SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL, E O GRAU DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM VHC

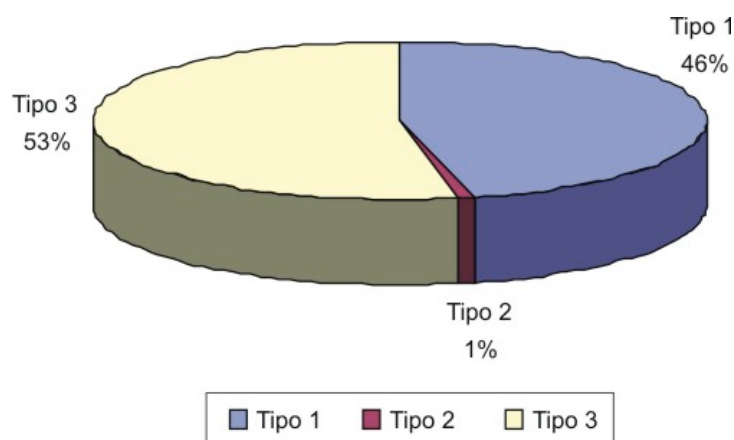


NOTA: As denominações alta, intermediária e baixa referem-se aos genótipos associados a alta (YA/YA and XA/YA), intermediária (YA/YO) e baixa concentração de MBL (XA/XA, XA/YO and YO/YO), respectivamente.

5.5 RELAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS *MBL2* E GENÓTIPOS DO VHC EM PACIENTES COM VHC

Entre os 95 pacientes avaliados quanto ao genótipo do VHC, observou-se que 50 (53%) casos tinham genótipo 3, 44 (46%) pacientes apresentavam genótipo 1 e somente 1(1%) caso tinha o genótipo 2, figura 19.

FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE GENÓTIPOS ENCONTRADOS NOS PACIENTES COM HEPATITE C



Não foi observado predomínio significativo de nenhum genótipo *MBL2* nos pacientes agrupados de acordo com o genótipo do VHC com o qual estavam infectados.

Tanto os pacientes infectados com VHC genótipo 1 como com genótipo 3 apresentaram maior frequência de genótipo *MBL2* associados com níveis elevados e intermediários de MBL. O único indivíduo com VHC genótipo 2 tinha genótipo *MBL2* YA/YA (tabela 7).

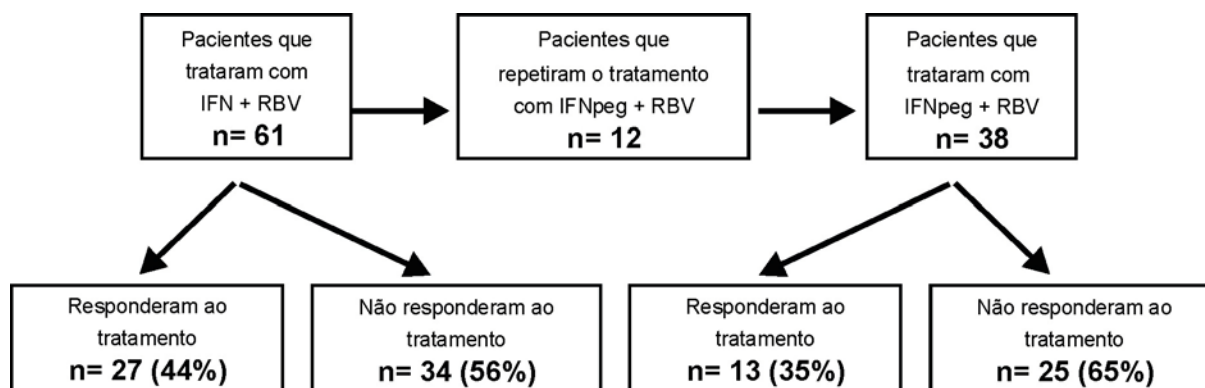
TABELA 7 - RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS *MBL2* E GENÓTIPOS DO VHC

GENÓTIPO <i>MBL2</i>	GENÓTIPOS VHC		
	VHC 1	VHC 3	VHC 2
YA/YA	13 (29,55%)	12 (24,00%)	1 (100,00%)
XA/YA	10 (22,73%)	13 (26,00%)	-
YA/YO	12 (27,27%)	19 (38,00%)	-
XA/XA	2 (4,55%)	2 (4,00%)	-
XA/YO	7 (15,91%)	2 (4,00%)	-
YO/YO	0 (0%)	2 (4,00%)	-
TOTAL	44	50	1

5.6 RESULTADOS DO TRATAMENTO COM IFN α E RBV EM PACIENTES COM HEPATITE C

Entre os 61 pacientes com hepatite por VHC que realizaram tratamento com IFN α , associado a ribavirina, 34 (56%) apresentaram NR ao tratamento e 27 (44%) evoluíram com RS ao tratamento.

FIGURA 20 - FLUXOGRAMA DO TRATAMENTO REALIZADO NOS PACIENTES COM HEPATITE C COM IFN α peg. OU RBV



5.6.1 Relação entre Genótipos *MBL2* e Resposta ao Tratamento com IFN α e RBV em Pacientes com VHC

Observou-se que entre os 34 pacientes com NR ao tratamento com IFN e RBV, 15 (44,1%) apresentavam genótipos *MBL2* relacionados à concentração alta, 12 (35,3%) intermediária e 7 (20,6%) concentração baixa de MBL. Entre os 27 casos com RS, foram observados 15 (55,5%), com genótipos *MBL2* associados à alta concentração sérica de MBL, 8 (29,6%) concentração intermediária e 6 (22,2%) concentração baixa de MBL. Não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos *MBL2* entre os pacientes com NR ou RS ao tratamento com IFN α e RBV para o VHC ($p=ns$), (tabela 8).

TABELA 8 - RELAÇÃO DO GENÓTIPO *MBL2* EM RELAÇÃO À RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN α E RBV

GENÓTIPOS	NR		RS		TOTAL		VALOR DE $p^{(1)}$
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
YA / YA	07	20,6	09	33,4	16	26,2	0,403
XA / YA	08	23,5	04	14,8	12	19,7	0,600
YA / YO	12	35,3	08	29,6	20	32,8	0,844
XA / YO	05	14,7	01	3,7	06	9,8	-
XA / XA	02	5,9	04	14,8	06	9,8	-
YO / YO	-	-	01	3,7	01	1,7	-
TOTAL	34	100,0	27	100,0	61	100,0	-

(1) Proporção.

5.7 RESULTADOS DO TRATAMENTO COM IFN α peg. E RBV EM PACIENTES COM VHC E ANÁLISE DOS FATORES RELACIONADOS À RESPOSTA FAVORÁVEL AO TRATAMENTO

Entre os 38 pacientes com VHC que realizaram tratamento com IFN α peg. associado à ribavirina, 13 (34,2%) evoluíram com RS ao tratamento e 25 (65,8%) apresentaram NR ao tratamento.

Entre os casos que apresentaram RS, houve menos pacientes que usaram IFN α peg. e RBV do que pacientes que usaram IFN α e RBV. A análise dos fatores de risco favoráveis à RS ao tratamento (PEARLMAN, 2004; POYNARD et al., 1998)

mostrou que no grupo que usou IFN α e RBV 12 entre 27 (44,4%) eram do sexo feminino e 19 entre 21 (90,5%) apresentavam genótipo grau 3 ou 2. No entanto, no grupo que foi tratado com IFN α peg. e RBV, entre os 13 pacientes, haviam 4 (30,8%) mulheres e 7 (53,8%) pacientes com genótipo 3 ou 2 (tabela 9).

TABELA 9 - FATORES DE RISCO FAVORÁVEIS A RS AO TRATAMENTO DA HEPATITE C COM IFN α OU IFN α peg. E RBV

	IFN + RBV (n=27) (44,3%)	IFNpeg. + RBV (n=13) (34,2%)
Sexo Feminino	12 (44,4%)	04 (30,8%)
Abaixo de 40 anos	03 (11,1%)	04 (30,8%)
Fibrose - Grau II	06 (22,2%)	04 (30,8%)
Fibrose - Grau III	11 (40,8%)	05 (38,4%)
Fibrose - Grau IV	10 (37,0%)	04 (30,8%)
Genótipo – I	⁽¹⁾ 02 (9,5%)	06 (46,2%)
Genótipo- II	⁽¹⁾ 01 (4,8%)	-
Genótipo – III	⁽¹⁾ 18 (85,7%)	07 (53,8%)

(1) 21 pacientes entre o total de 27 pacientes, foram avaliados quanto o genótipo do VHC

Entre os casos com NR, 7 (28%) já não tinham respondido ao tratamento prévio com IFN α e RBV e 6 deles apresentavam fibrose hepática grau III ou IV. Os genótipos *MBL2* desses sete casos foram: *LYPA/LYQB*; *LXPA/LYQA*; *HYP A/HYP A*; *LYPA/LYQB*; *HYP A/HYP D*; *HYP A/LYP A*; *HYP A/LYP B*. Entre estes pacientes que não responderam aos dois tratamentos, 5 (71,4%) apresentavam genótipos *MBL2* contendo mutações *X* ou *O* sendo que entre as mutações da região exon 1 houve um predomínio do alelo *B*.

5.7.1 Relação entre Genótipos *MBL2* e Resposta ao Tratamento com IFN α peg. e RBV em Pacientes com VHC

Para análise de associação, entre genótipos *MBL2* e resposta ao tratamento, separaram-se os genótipos em dois subgrupos, conforme já descrito por outros autores (MATSUSHITA et al., 1998b): genótipos homozigotos para alelos comuns da região promotora e exon 1 (*YA/YA*) e heterozigotos ou homozigotos para alelos mutantes da região promotora e do exon 1 (*YA/YO*, *XA/XA*, *XA/YO*, *YO/YO*). Genótipos *MBL2* contendo mutações *X* ou *O* foram associados à não-resposta ao tratamento com IFN α peg.,

sendo menos freqüentemente encontrados em pacientes IFN α peg. responsivos do que em não-responsivos (5/13, 38,5% vs 19/25, 75%, $p=0,023$, $OR=5,01$ $CI95\%=1,19 - 21,51$). Ressalta-se que a maioria dos pacientes com resposta sustentada apresentou genótipo do tipo YA/YA (61,5%) ($p=0,055$; probabilidade limítrofe que indica tendência) (tabela 10).

TABELA 10 - GENÓTIPOS *MBL2* EM RELAÇÃO A RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN α peg. E RBV EM PACIENTE COM VHC

GENÓTIPO	NR		RS		TOTAL		VALOR DE $p^{(1)}$
	N. º	%	N. º	%	N. º	%	
YA / YA	06	24,0	08	61,5	14	36,9	0,055
XA / YA	05	20,0	02	15,4	07	18,4	-
YA / YO	11	44,0	02	15,4	13	34,2	0,161
XA / XA	-	-	-	-	-	-	-
XA / YO	02	8,0	01	7,7	03	7,9	-
YO / YO	01	4,0	-	-	01	2,6	-
XA YA, YA / YO, XA / XA XA / YO, YO / YO	19	75	5	38,5	24	63	⁽²⁾ 0,023
TOTAL	25	100,0	13	100,0	38	100,0	-

(1) Proporção.

(2) $OR=5,01$ $CI=1,19 - 21,51$.

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que interações entre o VHC e o sistema imunológico do hospedeiro têm um papel decisivo na patogênese da hepatite C, ainda que os mecanismos exatos envolvidos nesta relação e a conseqüente progressão clínica da doença não estejam bem esclarecidos (BROWN et al., 2006).

Tanto fatores genéticos como a imunidade inata e adaptativa parecem ter relação com a evolução e até mesmo com o resultado do tratamento da hepatite C. Diferentes autores observaram associações importantes entre o polimorfismo gênico de marcadores imunológicos e a evolução da hepatite C.

Dawes et al. (2006) observaram possível influência na evolução da hepatite C pela presença da variante C77G no exon 4 do gene codificador da proteína CD45, essencial para adequada função do linfócito T.

Ainda, Kimura et al. (2006) observaram que a ocorrência de polimorfismo funcional no fator transformador de crescimento beta 1 (TGF β 1) acarreta sua menor produção e em conseqüência menor supressão das células NK havendo assim maior chance de resolução da infecção pelo VHC.

Neste estudo, como nos demais, realizou-se a análise do polimorfismo do gene *MBL2*, determinante de alteração funcional da MBL, importante proteína do sistema imune-inato na infecção pelo VHC.

6.1 HAPLÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES E CONTROLES

Devido ao grande desequilíbrio de ligação entre os SNPs na região promotora e no exon 1 do gene *MBL2*, somente sete haplótipos são comumente observados, ao contrário de 64 teoricamente possíveis. A associação destes polimorfismos relaciona-se com a expressiva variação nas concentrações circulantes da MBL, podendo variar em até 1.000 vezes, sendo que concentrações progressivamente menores de níveis séricos de MBL estão relacionadas aos seguintes haplótipos: *MBL2**HYPA > LYQA >

LYPA > *LXPA* >> *HYPD* = *LYPB* = *LYQC* (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006; DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006; MADSEN et al., 1995; BOLDT et al., 2006).

A frequência desses haplótipos varia de acordo com a região geográfica e constitui o reflexo do tempo de aparecimento das mutações iniciais, da história das migrações humanas e da pressão seletiva do ambiente (CASANOVA e ABEL, 2004). As frequências haplotípicas encontradas nos grupos de pacientes e controles deste estudo estão de acordo com as observadas em avaliações anteriores na população euro-brasileira, tendo-se encontrado um predomínio dos haplótipos relacionados à concentração normal ou elevada de MBL como *HYPB*, *LXPA* e *LYQA* e menor frequência dos haplótipos relacionados à concentração sérica baixa de MBL como *LYQC* e *HYPD* (BOLDT et al., 2006). Neste estudo foram observados oito haplótipos: *HYPB*, *LYPA*, *LYQA*, *LXPA*, *HYPD*, *LYPB*, *LYQC* e *LYPD*. Sendo que o haplótipo raro *LYPD* foi encontrado em apenas um indivíduo do grupo controle. Este haplótipo raro foi encontrado previamente na população europeia com frequência baixa de aproximadamente 1% (BOLDT et al., 2006; CEDZYNSKI et al., 2004; SKALNIKOVA et al., 2004). Acredita-se que o haplótipo *LYPD* tenha-se originado de uma recente recombinação intragênica entre *LYPA* e *HYPD* ou *LYPB* e *HYPD* (BOLDT et al., 2006).

A frequência do haplótipo *LYPB*, relacionado à deficiência de MBL, observada tanto nos pacientes quanto no grupo controle deste estudo (14% e 15% respectivamente), foi semelhante ao descrito em europeus (frequência alélica de 12%) (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006). Já em asiáticos descreve-se uma frequência mais alta deste haplótipo (22%), sendo o alelo mutante *MBL2*B* característico desse grupo étnico (LIPSCOMBE et al., 1996; BOLDT et al., 2006). Tal fato explica a razão de esta ser a única mutação encontrada em três estudos japoneses sobre polimorfismo gênico de MBL em pacientes com hepatite C (MATSUSHITA et al., 1998a e b; SASAKI et al., 2000). O presente estudo foi realizado em euro-brasileiros do Sul do país caracterizados pelo fenótipo da cor branca da pele e a procedência do estado do Paraná. Baseado no estudo do polimorfismo do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigens*), sabe-se que a importância da ancestralidade portuguesa nesta população é

repercutida pela semelhança existente entre as suas frequências haplotípicas com aquelas de populações ibéricas e mediterrâneas. Estima-se em 94% da subpopulação de indivíduos brancos a presença de haplótipos relativa a portugueses, italianos, alemães e poloneses. Sabe-se que o grau de miscigenação da população euro-brasileira com indivíduos de ascendência africana (ao sul do Saara) gira em torno de 2,5 a 14% e com ameríndios, em torno de 3,1 a 7% (BRAUN-PRADO et al., 2000, PROBST et al., 2000). Outro estudo com população do Nordeste do Brasil, altamente miscigenada, estão entre os poucos estudos sobre MBL e hepatite C realizados em população não-asiática (SEGAT et al., 2007).

6.2 GENÓTIPOS *MBL2* E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES E CONTROLES

A literatura relata a ocorrência de vinte e oito possíveis genótipos *MBL2* resultantes da combinação entre os haplótipos mais encontrados. Neste estudo observou-se um total de vinte e seis genótipos *MBL2* diferentes (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006).

Não há dúvida de que mutações no gene *MBL2* exercem a maior influência nos níveis circulantes de MBL, sendo que os genótipos *MBL2* se constituem em bons preditores da concentração plasmática da MBL na população geral. Entretanto, é importante destacar que há certos indivíduos cuja baixa concentração de MBL não pode ser explicada pelo genótipo *MBL2*. Os níveis séricos de MBL variam de forma expressiva entre indivíduos normais, de <10ng/ml até 10.000ng/ml e seus níveis são dinâmicos. A MBL atua como uma proteína de fase aguda, podendo elevar-se cerca de três vezes após infecção ou trauma cirúrgico e alterar-se de forma positiva ou negativa sob influência do hormônio do crescimento e de glicocorticóides (KILPATRICK, 2002a; BROWN et al., 2007). Não há consenso sobre qual nível de MBL se constitui em nível sérico normal (TAKAHASHI et al., 2006). A vantagem da avaliação do

genótipo *MBL2* para estudos de associação com doenças é que o genótipo não pode ser influenciado pela atividade da doença (KILPATRICK, 2002a).

Embora muitos indivíduos na população geral com níveis baixos ou elevados de MBL e portadores de diferentes mutações no gene *MBL2* não apresentem consequências patológicas devido a estas condições, diversos estudos de associação com doenças (DAHL et al., 2004; GARRED et al., 1995; SUMMERFIELD et al., 1997) demonstraram importante relação entre a suscetibilidade de infecções e variantes do gene *MBL2* (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006).

Diferentes autores têm demonstrado associação entre doenças infecciosas e níveis baixos de MBL e (ou) genótipos *MBL2* associados à baixa concentração sérica de proteína (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006; EISEN e MINCHINTON 2003; KILPATRICK, 2002a).

A associação clínica entre deficiência de MBL e aumento de suscetibilidade a infecções foi também demonstrada *in vivo* num modelo experimental utilizando-se camundongos deficientes de MBL, em que se observou elevada suscetibilidade à infecção sistêmica pelo vírus herpes simplex-2 (GADJEVA et al., 2004).

No presente estudo, verificou-se que a frequência do genótipo *MBL2**YA/YO, relacionado a níveis intermediários de multímeros de MBL no plasma, foi significativamente maior nos pacientes com VHC do que nos controles ($p=0,022$, $OR=2,29$, CI 95% 1,17- 4,46), o que sugere que este genótipo tenha um papel imunogenético no desenvolvimento da infecção crônica pelo VHC e talvez esteja associada à suscetibilidade a infecção pelo VHC em pacientes euro-brasileiros. Estes resultados sugerem, como no estudo de Jack et al. (2001b) que determinada concentração MBL, no caso deste estudo a concentração intermediária, teria um efeito dose/resposta quanto a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células secretoras hepáticas, como as células de Kupfer, contribuindo assim para a evolução à cronicidade da hepatite C.

Somi et al. (2007) também observaram frequência significativamente maior do genótipo *LYA/O* em 100 pacientes iranianos com VHC do que no grupo controle ($p=0,042$, $OR=2,31$). Segat et al. (2007), analisando somente os polimorfismos do

exon1, mostraram também predomínio significativo do genótipo *MBL2**A/O ($p=0,0017$) em pacientes com hepatite C do Nordeste do Brasil. Vale notar que esses autores registraram igualmente um aumento significativo do genótipo *MBL2**O/O nos pacientes com hepatite C quando comparados com os controles ($p=0,0017$).

A definição de deficiência de MBL não está ainda bem estabelecida. O nível de MBL fisiologicamente relevante ou que pode acarretar manifestações clínicas depende do tipo de doença (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006). Valores de *cut-off* diferentes foram usados como definição de deficiência de MBL em diversos estudos. Ensaio clínico demonstraram que foi necessária infusão de cerca de 200ng de MBL/ml plasma para reconstituir atividade da MBL *in vitro* em indivíduos deficientes de MBL (VALDIMARSSON et al., 2004). Em estudos com pacientes leucêmicos, os autores sugerem um nível de *cut-off* de 500 ng/ml (PETERSLUND et al., 2001) ou 1.000ng/ml (NETH et al., 2001). Em estudos com outras doenças, níveis ainda mais baixos como 100ng/ml foram usados para definir deficiência de MBL (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2006; MESSIAS-REASON et al., 2007). No atual estudo a mediana dos níveis de MBL dos pacientes com VHC e genótipo YA/YO foi de 370,5ng/ml; esses valores, segundo alguns autores, podem sugerir deficiência funcional protéica. Portanto, pacientes com genótipo *MBL2* YA/YO apresentaram níveis de MBL que sugerem deficiência funcional da proteína.

Por outro lado, observou-se neste estudo que os genótipos YO/YO, XA/YO e XA/XA, relacionados a baixos níveis de MBL, foram negativamente associados com a gravidade da fibrose hepática e, portanto, podem ter um efeito protetor contra a progressão da hepatite C. Assim, a presença destes polimorfismos do gene *MBL2* seria benéfica na evolução clínica de pacientes com VHC. Estes resultados sugerem que níveis séricos mais elevados de MBL determinariam maior ligação protéica ao VHC propiciando atividade inflamatória intra-hepática mais grave, com conseqüente evolução para graus de fibrose mais grave.

Um papel protetor de genótipos deficientes de MBL contra o desenvolvimento de doenças crônicas tem sido relatado por diferentes autores. A preservação ao

longo dos anos dos haplótipos de *MBL2* que conferem deficiência da concentração protéica de MBL já sugere que a suficiência na MBL circulante pode conferir alguma desvantagem biológica. Portanto, enquanto alguns indivíduos podem beneficiar-se da expressão de altos níveis de proteína outros se beneficiam de níveis reduzidos de MBL circulante, dependendo do tipo de patógeno e mecanismo da doença.

Tem sido proposto que a ligação da MBL ao patógeno facilita a sua opsonização e fagocitose, aumentando a infectividade de alguns organismos intracelulares (WORTHLEY, BARDY e MULLIGHAN, 2005). Diversos autores demonstraram ação protetora da deficiência de MBL em infecções por *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* e leishmaníase visceral (DORNELLES, PEREIRA-FERRARI e MESSIAS-REASON, 2006; HOAL-VAN HELDEN et al., 1999; SOBORG et al., 2003; SANTOS et al., 2001).

O *status* da MBL pode também ser tanto vantajoso ou não quando considerado o ponto de vista da gravidade de algumas doenças (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006). Garred et al. (2000) descreveram que a deficiência de MBL estaria relacionada ao aparecimento precoce de artrite reumatóide; todavia esta relação não foi observada nos pacientes com doença avançada ou de aparecimento tardio. Schafransky et al. (2004) e Messias-Reason et al. (2006) observaram que pacientes com cardiopatia reumática crônica apresentaram tanto aumento significativo de genótipos associados a níveis elevados de MBL como elevada concentração sérica da proteína, quando comparados com controles normais. Os autores sugerem um papel pró-inflamatório da MBL e ativação indesejável do sistema de complemento no processo crônico de cardite reumática.

Visto que a MBL tem a capacidade de reconhecer estruturas alteradas próprias do organismo em condições de estresse e de infecção, a MBL tem sido relacionada na fisiopatologia da injúria causada por isquemia seguida de reperfusão. Diferentes autores descreveram que o bloqueio isolado da via MBL de ativação do complemento protege de lesão da musculatura esquelética, miocárdica e de lesão

gastrointestinal, após isquemia seguida de reperfusão sangüínea nesses locais (CHAN et al., 2006, WALSH et al., 2005; HART et al., 2005).

Todos esses achados, portanto, corroboram com o papel pró-inflamatório da MBL nas doenças crônicas (HISANO et al., 2007; CHAN et al., 2006; WALSH et al., 2005; HART et al., 2005; SCHAFRANSKY et al., 2004; DORNELLES, PEREIRA-FERRARI e MESSIAS-REASON, 2006).

Além disso, estudos têm relatado que a MBL está associada à gravidade e evolução de várias doenças, como hepatite B a síndrome da imunodeficiência adquirida (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

Tem-se demonstrado que a MBL participa da resposta do hospedeiro ante a diversos tipos de vírus como o da imunodeficiência adquirida (HIV), influenza A, Ebola, Marburg, Herpes Simplex Vírus 2, VHB e VHC (BROWN et al., 2007). Em relação ao VHB, estudos sugerem associações significativas de níveis de MBL, determinados pelos genótipos *MBL2*, com a persistência do VHB e progressão da doença (CHONG et al., 2006; THIO et al., 2005; YUEN et al., 1999). A ocorrência de interação entre glicoproteínas do VHB e MBL foi demonstrada em estudos *in vitro* (CHONG et al., 2006).

O VHC, assim como o VHB, codifica duas proteínas virais do envelope altamente glicosiladas E1 e E2, que poderiam ser alvos potenciais de interação com a MBL (BROWN et al., 2007).

6.3 GENÓTIPOS *MBL2*, FIBROSE HEPÁTICA E CONCENTRAÇÃO DE MBL EM PACIENTES COM VHC

Neste trabalho analisou-se o polimorfismo de *MBL2* em um grupo bastante homogêneo de pacientes com hepatite C em que todos os casos apresentavam comprometimento hepático de moderado a intenso, comprovado por biópsia hepática, além de positividade ao teste de PCR para o RNA viral. Nenhum paciente apresentava co-infecção com VHB ou HIV, nem tinha histórico de abuso alcoólico ou era obeso.

Evitou-se, dessa forma, a inclusão de pacientes com doença muito leve, que não eram candidatos a tratamento ou sem a comprovação exata da presença viral, como ocorrido em outros estudos sobre MBL e hepatite C (MATSUSHITA et al., 1998a e b; SASAKI et al., 2000). O interesse maior deste estudo era a avaliação de pacientes que poderiam evoluir para doença hepática mais avançada. Idealmente, deveria ter-se incluído no estudo um número representativo de pacientes contaminados pelo VHC com três principais formas evolutivas: casos com cura espontânea, casos sem evolução para lesão hepática após longo período de acompanhamento e casos com evolução para comprometimento hepático de graus variados após igual período de acompanhamento. Contudo, como o tempo de evolução da hepatite C é muito variado, a data da contaminação viral freqüentemente não é conhecida, casos de cura espontânea não são freqüentes e casos de hepatite aguda são raros, torna-se difícil a obtenção de uma população que possa ser considerada representativa.

Os critérios adotados para seleção de pacientes neste estudo e os resultados encontrados permitem a hipótese de que há maior risco de cirrose nos pacientes com MBL elevada. Isto está em concordância com os recentes achados de Brown et al. (2006), quando afirmaram que a gravidade da infecção pelo VHC está associada ao aumento da atividade do complexo MBL/MASP-1. Estes pesquisadores observaram que o nível sérico da MBL e a atividade enzimática do complexo *MBL/MASP1* estavam mais elevado em pacientes com VHC e fibrose severa quando comparados a pacientes com fibrose mais leve, outra doença hepática não causada por VHC ou controles sadios. O estudo não conseguiu distinguir entre a possibilidade da fibrogênese estar relacionada à elevação da atividade do complexo MBL/MASP-1 ou estar associada à maior produção de MBL ou MASP-1. Kilpatrick et al. (2003) também observaram associação não-significativa entre níveis baixos de MBL e hepatite C mais leve quando comparados com casos graves.

O desenvolvimento de fibrose hepática nos pacientes com VHC permanece pouco esclarecido. Um estudo prévio realizado em um centro de plasmaferese onde ocorreu contaminação pelo VHC ao mesmo tempo e com mesmo tipo de vírus

demonstrou um padrão variado de progressão de doença nos pacientes infectados (DATZ et al., 1999). Este fato indica que fatores do hospedeiro estejam envolvidos no desenvolvimento da fibrose (BROWN et al., 2007)

De fato, muitos fatores podem estar envolvidos na evolução da fibrose hepática em pacientes com VHC. Sabe-se que cinco fatores independentes estão associados à taxa de progressão da fibrose como: sexo masculino, idade na contaminação (progressão é mais rápida nos pacientes acima dos quarenta anos), duração da infecção, co-infecção com VHB e HIV, grupo étnico, uso diário de álcool acima de 50g/dia e esteatose hepática (AFDHAL, 2004; MASSARD et al., 2006). Vários desses fatores foram afastados na seleção dos pacientes para o presente estudo, com poucas exceções, como a idade na contaminação e a duração da infecção. É possível que no futuro a comprovação de um distúrbio imunológico, relacionado ao polimorfismo da MBL, venha a fazer parte dos fatores de risco para progressão à cirrose por hepatite C, como os demais fatores acima listados.

6.4 RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN α OU IFN α peg. E RBV EM PACIENTES COM HEPATITE C

Observou-se neste estudo que a taxa de resposta ao tratamento para hepatite C foi semelhante à encontrada na literatura internacional. Este fato vem ao encontro do que já foi observado nesta cidade (ACRAS et al., 2004). No entanto, um número maior de pacientes com VHC apresentou RS ao tratamento com IFN α e RBV (27/61, 44%) do que os que foram tratados com IFN α peg. e RBV (13/38, 34%), contrariamente ao esperado para pacientes virgens de tratamento.

Ao analisar-se os fatores de risco favoráveis a RS nos pacientes que foram tratados com IFN α e (ou) IFN α peg. e RBV deste estudo (PEARLMAN, 2004; POYNARD et al., 1998), observa-se que a principal diferença deveu-se ao maior número de pacientes com genótipo 2 ou 3 entre os casos que receberam IFN α e RBV (19/21-90,5%). Acredita-se que o genótipo é o fator preditivo de resposta mais

importante visto que pacientes com genótipo 2 ou 3 apresentam boa resposta à terapia combinada, perto de 60% contra 30 a 40% daqueles com genótipo 1 (Coelho et al., 2006). Além disso, sete casos (53,8%) tratados com IFN α peg. e RBV, já não haviam apresentado RS em tratamento prévio com IFN α e RBV, o que diminuiu a chance de resposta a um novo tratamento.

6.5 RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS *MBL2* E RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN α OU IFN α peg. E RBV EM PACIENTES COM VHC

A relação entre a resposta ao tratamento para hepatite C com IFN α ou IFN α peg. associados a RBV e fatores imunológicos do hospedeiro já foi estudada por muitos autores. Hwang et al. (2006) analisaram retrospectivamente as diferenças genéticas de pacientes com VHC que estavam associadas à resposta ao tratamento com IFN α e RBV. Os autores encontraram cerca de 26 polimorfismos gênicos na comparação de pacientes respondedores e não-respondedores ao tratamento, tendo selecionado 7 genes associados à resposta ao tratamento. Assim criaram um modelo genético preditivo da resposta ao tratamento com IFN α e RBV. Outros autores observaram que um polimorfismo na posição 308, da região promotora do fator alfa de necrose tumoral, está associado à resposta virológica sustentada em pacientes tratados com altas doses de IFN α associado a RBV (DAI et al., 2006).

Segundo Kanto e Hayashi (2006), ambas as respostas imunes inata e específica ao VHC exercem um papel importante no sucesso do tratamento para hepatite C, visto que tanto o IFN α quanto a RBV apresentam atividade imunomodulatória *in vivo*. Permanece pouco compreendida, no entanto, a natureza dos mecanismos pelos quais a terapia antiviral traz a resolução da infecção pelo VHC (ROSEN, 2003).

Em adição a sua ação antiviral direta, o IFN α pode interagir com a resposta imune-inata e adaptativa, aumentando a resposta antiviral (FELD e HOOFNAGLE, 2005). Após o início do tratamento com interferon, o RNA-VHC decresce em um padrão bifásico dentro de duas semanas. Acredita-se que a rápida queda da carga viral na

primeira semana esteja relacionada a uma inibição do IFN α à produção de VHC ou a liberação do VHC do hepatócito, já o decréscimo lento da segunda fase seja resultante da eliminação imunomediada dos hepatócitos infectados. Nesta fase os níveis circulantes de VHC estão suprimidos quase a zero, estes níveis diminuirão ainda mais caso a MBL estiver com sua função normal, mas poderá não ocorrer a redução do RNA do VHC ou ocorrer em menor grau caso estejam presentes variantes genotípicas, como a variante *B* do exon 1 (MATSUSHITA et al., 1998b).

Em relação à resposta ao tratamento com IFN α peg. e RBV observou-se neste estudo uma associação entre os polimorfismos *O* ou *X*, determinantes de baixa concentração de MBL e a não-resposta ao tratamento. Esta associação foi observada inclusive em 71,4% (5/7) dos pacientes que não responderam aos dois tratamentos com IFN α e INF peg. Esses achados foram similares aos dois relatos de Matsushita (MATSUSHITA et al., 1998a e b), que descreveram associação dos alelos *X* e *B* com baixa resposta ao tratamento com IFN α isolado em pacientes japoneses com infecção pelo VHC. Outros dois estudos, no entanto, de KILPATRICK et al., 2003 e SEGAT et al., 2007, não encontraram relação estatisticamente significativa entre baixos níveis de MBL e resposta ao tratamento com IFN α isolado ou associado a RBV ou IFN α peg. associado com ribavirina. Deve-se levar em conta, no entanto, que o estudo de Kilpatrick et al. analisou somente a concentração sérica da MBL e o de Segat et al. somente analisou a resposta na 12.^a semana do tratamento e não avaliou a RS.

A avaliação do papel da MBL na resposta imunológica durante o tratamento medicamentoso da hepatite C, assim como a comparação dos resultados de diferentes estudos sobre MBL em hepatite C, torna-se difícil visto que muitas variáveis podem interferir no sucesso deste tratamento e conseqüentemente na interpretação dos fatores contribuintes para tal. Entre os fatores que podem interferir no resultado do tratamento deve-se citar o uso de IFN α ou IFN α peg., associado à ribavirina ou não, fatores relacionados ao hospedeiro e fatores relacionados ao VHC. Sabe-se que a frequência de RS ao tratamento da hepatite C com IFN α peg. e RBV é superior ao IFN α e RBV ou

IFN α isolado, em especial nos casos de hepatite C com genótipo 1 ou pacientes com cirrose (PEARLMAN, 2004). Portanto, o ideal é que o estudo de fatores associados a RS seja realizado em pacientes tratados com IFN α peg. e RBV, conforme foi avaliado neste estudo. Entre os fatores relacionados ao hospedeiro, que geralmente não são definidos com clareza pelos estudos realizados, compreende o sexo, idade, grau de fibrose, peso corporal, raça, presença de co-morbidades, tais como: abuso alcoólico, doença renal e co-infecção por HIV. Todas estas variáveis foram afastadas durante a seleção da população para o presente estudo. Fatores relacionados ao próprio vírus compreende o genótipo viral, carga viral, diversidade das quasispécies e infecção aguda ou crônica (FELD e HOOFNAGLE, 2005) podem interferir no resultado do tratamento. No presente estudo havia um maior número de pacientes com genótipo 3, como é característico do Sul do Brasil (CAMPIOTTO et al., 2005) e alta prevalência deste genótipo entre os casos tratados com IFN α e RBV. Os resultados deste estudo, portanto, sugerem que a MBL tenha um papel como molécula de reconhecimento imune, na eliminação do VHC durante terapia com IFN α peg. e RBV.

Estes achados podem contribuir na triagem de casos potencialmente respondedores ao tratamento com INF peg. e RBV visto que o tratamento atual, realizado com IFN α peg. e RBV, está associado a cerca de 50% de não-resposta, além de ser longo e de poder causar variados efeitos colaterais.

Quanto melhor for demonstrada a participação da resposta imunológica na patogênese da infecção pelo VHC, e na resposta ao tratamento com IFN α peg. e RBV, melhores estratégias terapêuticas poderão ser futuramente desenvolvidas, que redundarão em melhor qualidade de vida ao paciente com hepatite C.

Futuros estudos incluindo todas as modalidades evolutivas de pacientes com hepatite C deverão ser conduzidos e poderão demonstrar se o polimorfismo do gene *MBL2* está associado à suscetibilidade à infecção *per se* pelo VHC.

7 CONCLUSÕES

- 1) Polimorfismos do gene *MBL2*, analisados em pacientes euro-brasileiros do Sul do Brasil, mostraram associação com a infecção crônica pelo VHC, sugerindo seu envolvimento na patogênese da doença.
- 2) A frequência significativamente aumentada do genótipo *MBL2*YA/YO*, relacionado a níveis séricos intermediários de MBL, nos pacientes quando comparados aos controles ($p=0,022$, $OR=2,29$, $CI=95\%$ 1,17 – 4,46), sugere um papel imunogenético deste genótipo no desenvolvimento da infecção crônica pelo VHC.
- 3) Os genótipos *YO/YO*, *XA/YO* e *XA/XA*, relacionados a baixos níveis de MBL, foram negativamente associados à gravidade da fibrose hepática ($p=0,04$, $OR=0,24$, $CI=95\%$ 0,06 – 0,99) e, portanto, podem ter um efeito protetor contra a progressão da hepatite C.
- 4) A associação entre os polimorfismos *O* ou *X*, determinantes de baixa concentração de MBL, e a não-resposta ao tratamento com IFN α peg. e RBV ($p=0,023$, $OR=5,01$ $CI95\%=$ 1,19 – 21,51) sugere que genótipos mutantes predispõem a falha de resposta ao tratamento imunomodulador na hepatite C.
- 5) Os resultados sugerem associação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e hepatite crônica por VHC, estando a mesma relacionada à progressão da fibrose hepática e à resposta ao tratamento com IFN α peg e RBV.

REFERÊNCIAS

- ACRAS, R. N.; PEDROSO, M. L. A.; CAUM, L. C. et al. The sustained response rates for chronic hepatitis C patients undergoing therapy with the several interferons and ribavarins supplied by Brazilians Health Ministry is comparable to those reported in the literature]. **Arq Gastroenterol**, v.41, n.1, p.3-9, Jan./Mar. 2004.
- AFDHAL, N. H. The natural history of hepatitis C. **Semin Liver Dis**, v.24, p.3-8, 2004. (Suppl 2)
- ALTER, H. J.; HOLLAND, P. V.; MORROW, A. G. et al. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. **Lancet**, v.2, n.7940, p.838-41, Nov. 1975.
- ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C in the West. **Semin Liver Dis**, v.15, n.1, p.5-14, Feb. 1995.
- ALTER, M. J.; KRUSZON-MORAN, D.; NAINAH, O. V. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States 1988 through 1994. **N Engl J Med**, v.341, p.556-562, 1999.
- AMOROSO, A.; BERRINO, M.; BONIOTTO, M. et al. Polymorphism at codon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. **AIDS**, v.13, n.7, p.863, May 1999.
- ANZOLA, M.; BURGOS, J. J. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, Nov. 2003.
- BARRETT, S.; RYAN, E.; CROWE, J. Association of the HLA-DRB1*01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. **J Hepatol**, v.30, n.6, p.979-83, Jun. 1999.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v.24, n.2, p.289-93, Aug. 1996.
- BEHRENS, S. E.; TOMEI, L.; DE FRANCESCO, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. **EMBO J**, v.15, n.1, p.12-22, Jan. 1996.
- BELLAMY, R.; RUWENDE, C.; MCADAM, K. P et al. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. **QJM**, v.91, n.1, p.13-8, Jan. 1998.
- BERENGUER, M. Management of hepatitis C virus in the transplant patient. **Clin Liver Dis**, v.11, n.2, p.355-76, May 2007.
- BERNIG, T.; BREUNIS, W.; BROUWER, N. et al. An analysis of genetic variation across the MBL2 locus in Dutch Caucasians indicates that 3' haplotypes could modify circulating levels of mannose-binding lectin. **Hum Genet**, v.118, n.3-4, p.404-15, Dec. 2005.
- BLIGHT, K. J.; KOLYKHALOV, A. A.; RICE, C. M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. **Science**, v.290, n.5498, p.1972-4, Dec. 2000.
- BODE, J. G.; BRENNENDORFER, E. D.; HAUSSINGER, D. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. **Arch Biochem Biophys**, v.462, n.2, p.254-65, Jun. 2007.

BOLDT, A. B.; CULPI, L.; TSUNETO, L. T. et al. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. **Hum Immunol**, v.67, n.9, p.722-34, Sep. 2006.

BOWDEN DS, BERZSENYI MD. Chronic hepatitis C virus infection: genotyping and its clinical role. **Future Microbiol**, v.1, p.103-12, Jun. 2006.

BRANDÃO, A. B.; FUCHS, S. C. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in southern Brazil: a case-control study. **BMC. Gastroenterol**, v.8, n.2, p.18, Aug. 2002..

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 860. Anexo I: Protocolo Clínico e diretrizes terapêuticas da hepatite viral crônica tipo C. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 de novembro de 2002.

BRAUN-PRADO, K.; VIEIRA MION, A. L.; FARAH PEREIRA, N. et al. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v.56, n.5, p.417-27, Nov. 2000.

BROWN, K. S.; KEOGH, M. J.; TAGIURI, N. et al. Severe fibrosis in hepatitis C virus-Infected patients Is associated with increased activity of the Mannan-Binding Lectin (Mbl)/ Mbl-Associated Serine Protease 1 (Masp-1) Complex. **Clin Exp Immunol**, v.147, p.90-8, 2006.

BROWN, K. S.; RYDER, S. D.; IRVING, W. L. et al. Mannan binding lectin and viral hepatitis. **Immunol Lett**, v.108, n.1, p.34-44, Jan. 2007.

BURGOS, M. A.; JUAN, J. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, 2003.

BURNET, F. M; McCREA, J. F. Inhibitory and inactivating action of normal ferret sera against an influenza virus strain. **Aust J Exp Biol Med Sci**, v.24, p.277-82, 1946.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J. R.; CARRILHO, F. J. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.1, p.41-9, Jan. 2005.

CANDY, D. C. A.; LARCHER, V. F.; TRIPP, J. H. Yeast opsonisation in children with chronic diarrhoeal states. **Arch Dis Child**, v.55, n.3, p.189-93, Mar. 1980.

CARITHERS, R. L. J. R.; EMERSON, S. S. Therapy of hepatitis C: meta-analysis of interferon alfa-2b trials. **Hepatology**, v.26, n.3, p.83S-88S, Sep. 1997. (Suppl 1)

CARRILHO, F. J.; CORRÊA, M. C. J. M. Magnitude of hepatitis B and C in Latin American. In: SCHINAZI, R. F.; SOMMADOSSI, J-P; THOMAS, H. C. (Eds.). **Therapies for viral Hepatitis**. London: International Medical, 1998. p.25-34.

CARROLL M.C. The complement system in regulation of adaptive immunity. **Nat Immunol**, v.5, n.10, p.981-6, Oct. 2004.

CASANOVA, J. L.; ABEL, L. Human Mannose-binding Lectin in Immunity: Friend, Foe, or Both? **J Exp Med**, v.199, n.10, p.1295-9, May 2004.

CEDZYNSKI, M.; SZEMRAJ, J.; SWIERZKO, A. S. et al. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. **Clin Exp Immunol**, v.136, n.2, p.304-11, May 2004.

CHAN, R. K.; IBRAHIM, S. I.; TAKAHASHI, K. et al. The differing roles of the classical and mannose-binding lectin complement pathways in the events following skeletal muscle ischemia-reperfusion. **Immunol**, v.177, n.11, p.8080-5, Dec. 2006.

CHEONG, J. Y.; CHO, S. W.; LIM, S. K. Lack of association between hepatitis B virus infection and polymorphism of mannose-binding lectin gene in Korean population. **J Korean Med Sci**, v.20, n.1, p.65-9, Feb. 2005.

CHISARI, F. V. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. **Nature**, v.436, n.7053, p.930-2, 2005.

CHONG, W. P.; TO, Y. F.; IP, W. K. et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. **Hepatology**, v.42, n.5, p.1037-45. Nov. 2005. Erratum in: **Hepatology**, v.43, n.1, p. 99, Jan. 2006.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non A non B viral hepatitis genome. **Science**, Washington, v.244, p.359-361, 1989.

COELHO, H. S. M. Tratamento da Hepatite C crônica. In: COELHO, H. S. M.; SOARES, J. A. S.; BRANDÃO-MELLO, C. E.; NABUCO, L. C. **Hepatites**. Rio de Janeiro: Rubio, 2006. p.121-130.

CRAMP, M. E.; CARUCCI, P.; ROSSOL, S. et al. Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia. **Gut**, v.44, n.3, p.424-429, Mar. 1999.

DAHL, M.; YBJAERG-HANSEN, A.; SCHNOHR, P.; NORDESTGAARD, B. G. A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. **J Exp Med**, v.199, n.10, p.1391-9, May 2004.

DAI, C. Y.; CHUANG W.L.; LEE, L. P. et al. Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**, v.13, n.11, p.770-4, Nov. 2006.

DATZ, C.; CRAMP, M.; HAAS, T. et al. The natural course of hepatitis C virus infection 18 years after an epidemic outbreak of non-A, non-B hepatitis in a plasmapheresis centre. **Gut**, v.44, n.4, p.563-7, Apr. 1999.

DAVIS, G. L.; WONG, J. B.; McHUTCHISON, J. G. Manns MP, Harvey J, Albrecht J. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.38, n.3, p.645-52, Sep. 2003.

DAWES, R.; HENNIG, B.; IRVING, W. et al. Altered CD45 expression in C77G carriers influences immune function and outcome of hepatitis C infection. **J Med Genet**, v.43, n.8, p.678-84, Aug. 2006.

DEFORGES, S.; EVLASHEV, A.; PERRET, M. et al. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. **J Gen Virol**, v.85, (Pt 9), p.2515-23, Sep. 2004.

DEUFFIC, S.; BUFFAT, L.; POYNARD, T.; VALLERON A.-J. Modeling the hepatitis C virus epidemic in France. **Hepatology**, v.29, n.5, p.1596-601, May 1999.

DI BISCEGLIE, A. M. **Natural history of hepatitis C**. Disponível em: <<http://clinicaloptions.com/hepatitis/Annual%20Updates/2003/2003%20Annual%20Update/>>.

DOMMETT, R. M.; KLEIN, N.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**, v.68, n.3, p.193-209, Sep. 2006.

DONATO, F.; BOFFETTA, P.; PUOTI, M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing. **Int J Cancer**, v.75, n.3, p.347-54, 1998.

DORNELLES, L. N.; PEREIRA-FERRARI, L.; MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. **Clin Exp Immunol**, v.145, p.463-8, 2006.

DUMESTRE-PERARD, C.; PONARD, D.; ARLAUD, G. J. et al. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. **Mol Immunol**, v.39, n.7-8, p.465-73, Nov. 2002.

EISEN, D. P.; MINCHINTON, R. M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. **Clin Infect Dis**, v.37, p.1496-505, 2003.

ENOMOTO, N.; SAKUMA, I.; ASAHINA, Y. et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. **J Clin Invest**, v.96, n.1, p.224-30, Jul. 1995.

ENOMOTO, N.; SAKUMA, I.; ASAHINA, Y. et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N Engl J Med**, v.334, n.2, p.77-81, Jan. 1996.

FELD, J. J.; HOOFNAGLE, J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v.436, n.7053, p.967-72, Aug. 2005.

FERRERO, S. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10-year survey (1990-2000). **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.82, n.3, p.229-34, Mar. 2003.

FOCACCIA, R.; DA CONCEIÇÃO, O. J.; SETTE, J. R. et al. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. **Braz J Infect Dis**, v.2, n.6, p.269-284, Dec. 1998.

FONTAINE, H.; NALPAS, B.; POULET, B. et al. Hepatitis activity index is a key factor in determining the natural history of chronic hepatitis C. **Hum Pathol**, v.32, n.9, p.904-9, Sep. 2001.

FORTON, D. M.; KARAYIANNIS, P.; MAHMUD, N. et al. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. **J Virol**, v.78, n.10, p.5170-83, May 2004.

FRANK, C.; MOHAMED, M. K.; STRICKLAND, G. T. et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. **Lancet**, v.355, p.887-91, 2000.

FRIED, M. W.; SHIFFMAN, M. L.; REDDY, K. R. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v.347, n.13, p.975-82, Sep. 2002.

FUJITA, T.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y. The lectin-complement pathway: its role in innate immunity and evolution. **Immunol Rev**, v.198, p.185-202, Apr. 2004.

GADJEVA, M.; PALUDAN, S. R.; THIEL, S. et al. Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. **Clin Exp Immunol**, v.138, n.2, p.304-11, Nov. 2004.

GALE JR., M.; FOY, E. M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. **Nature**, v.436, n.7053, p.939-45, Aug. 2005. Erratum in: **Nature**, v.437, n.7056, p.290, Sep. 2005.

GARRED, P. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. **Clin Exp Immunol**, v.90, n.3, p.517-21, Dec. 1992.

GARRED, P.; MADSEN, H. O.; KURTZHALS, J. A. et al. Diallelic polymorphism may explain variations of blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. **Eur J Immunogenet**, v.19, p.403-412, 1992.

GARRED, P.; HARBOE, M.; OETTINGER, T. et al. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? **Eur J Immunogenet**, v.21, p.125-31, 1994.

GARRED, P.; MADSEN, H. O.; HOFMANN, B.; SVEJGAARD, A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. **Lancet**, v.346, n.8980, p.941-3, Oct. 1995.

GARRED, P.; MADSEN, H. O.; MARQUART, H. et al. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. **J Rheumatol**, v.27, n.1, p.26-34, Jan. 2000 .

GARRED, P.; LARSEN, F.; MADSEN, H.O.; KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. **Mol Immunol**, v.40, n.2-4, p.73-84, Sep. 2003.

GAYOTTO, L. C. C. Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. **GED**, v.19, p.137-140, 2000.

GRAKOU, A. Hepatitis C vírus infection. How does the host respond? **Minerva Gastroenterol Dietol**, v.50, n.1, p.21-8, 2004.

GREMION, C.; CERNY, A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. **Rev Med Virol**, v.15, n.4, p.235-68, 2005.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, n.2, p.361-72, Jun. 1992.

HADZIYANNIS, S. J.; SETTE, H. J. R.; MORGAN, T. R. et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. **Ann Intern Med**, v.140, n.5, p.346-55, Mar. 2004.

HART, M. L.; CEONZO, K. A.; SHAFFER, L. A. et al. Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. **J Immunol**, v.174, n.10, p.6373-80, May 2005.

HISANO, S.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. et al. Activation of the lectin complement pathway in post-streptococcal acute glomerulonephritis. **Pathol Int**, v.57, n.6, p.351-7, Jun. 2007.

HOAL-VAN HELDEN, E. G.; EPSTEIN, J.; VICTOR, T. C. et al. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. **Pediatr Res**, v.45(4 Pt 1), p.459-64, Apr. 1999.

HOHLER, T.; WÜNSCHEL, M.; GERKEN, G. et al. No association between mannose-binding lectin alleles and susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in German patients. **Exp Clin Immunogenet**, v.15, n.3, p.130-3, 1998.

HOKOZAKI, Y.; YOSHIBA, M.; SEKIYAMA, K. et al. Mannose-binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. **Liver**, v.22, n.1, p.29-34, Feb. 2002.

HOOFNAGLE, J. H.; MULLEN, K. D.; JONES, D. B. et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon: a preliminary report. **N Engl J Med**, v.315, n.25, p.1575-8, Dec. 1986.

HWANG, Y.; CHEN, E. Y.; GU, Z. J. et al. Genetic predisposition of responsiveness to therapy for chronic hepatitis C. **Pharmacogenomics**, v.7, n.5, p.697-709, Jul. 2006.

IBARROLA, N.; MORENO-MONTEAGUDO, J. A.; SÁIZ, M. et al. . Response to retreatment with interferon-alpha plus ribavirin in chronic hepatitis C patients is independent of the NS5A gene nucleotide sequence. **Am J Gastroenterol**, v.94, n.9, p.2487-95, Sep. 1999.

IKEDA, K.; SANNOH, T.; KAWASAKI, N. et al. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **J Biol Chem**, v.262, p. 451-7454, 1987.

ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L. et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **J Hepatol**, v.22, n.6, p.696-9, Jun. 1995.

JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunol Rev**, v.180, p.86-99, Apr. 2001a.

JACK D.L.; Read R.C.; Tenner A.J. et al. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to Neisseria meningitidis serogroup B. **J Infect Dis**;184:1152-62 2001b.

JAGGY, C.; VON OVERBECK, J.; LEDERGERBER, B. et al. Mortality in the Swiss HIV Cohort Study (SHCS) and the Swiss general population. **Lancet**, v.362, n.9387, p.877-8, Sep. 2003.

JENSENIUS, J. C.; JENSEN, P. H.; MCGUIRE, K. et al. Recombinant mannan-binding lectin (MBL) for therapy. **Biochem Soc Trans**, v.31(Pt 4), p.763-7, Aug. 2003

JULIGER, S.; LUCKNER, D.; MORDMULLER, B. et al. Promoter variants of the human mannose-binding lectin gene show different binding. **Biochem Biophys Res Commun**, v.275, p.617-22, 2000.

- KALDOR, J. M.; ARCHER, G. T.; BURING, M. L. et al. Risk factors for hepatitis C virus infection in blood donors: a case-control study. **Med J Aust**, v.157, n.4, p.227-30, Aug. 1992.
- KANTO, T.; HAYASHI, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Intern Med**, v.45, n.4, p.183-91, 2006.
- KAWASAKI, T.; ETOH, R.; YAMASHINA, T. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v.81, n.3, p.1018-24, Apr. 1978.
- KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochim Biophys Acta**, v.1572, n.2-3, p.401-13, Sep. 2002b.
- KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfus Med**, v.12, n.6, p.335-52, Dec. 2002a.
- KILPATRICK, D. C.; DELAHOOKE, T. E.; KOCH, C. et al. Mannan-binding lectin and hepatitis C infection. **Clin Exp Immunol**, v.132, n.1, p.92-5, Apr. 2003.
- KIM, D. W.; GWACK, Y.; HAN, J. H.; CHOE, J. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v.215, n.1, p.160-6, Oct. 1995.
- KIMURA, T.; SAITO, T.; YOSHIMURA, M. et al. Association of transforming growth factor-beta 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. **Infect Dis**, v.193, n.10, p.1371-4, May 2006.
- KIYOSAWA, K. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in Japan. **J Med Virol**, v.33, n.2, p.114-6, Feb. 1991.
- KOCH, A.; MELBYE, M.; SORENSEN, P. et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. **JAMA**, v.285, n.10, p.1316-21, Mar. 2001.
- KRAMER, L.; BAUER, E.; FUNK, G. et al. . Subclinical impairment of brain function in chronic hepatitis C infection. **J Hepatol**, v.37, n.3, p.349-54, Sep. 2002.
- KREMSDORF, D.; BREZILLON, N. New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies. **World J Gastroenterol**, v.13, n.17, p.2427-35, May 2007.
- KUO, G.; CHOO, Q. L.; ALTER . et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. **Science**, v.244, p.362-4, 1989.
- LARSEN, F.; MADSEN, H. O.; SIM, R. B. et al. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. **J Biol Chem**, v.279, n.20, p.21302-11, May 2004.
- LEFKOWITCH, J. H.; SCHIFF, E. R.; DAVIS, G. L. et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B: the Hepatitis Interventional Therapy Group. **Gastroenterology**, v.104, n.2, p.595-603, Feb. 1993.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v.436, p.933-938, Aug. 2005.

LINDENBACH, B. D.; EVANS, M. J.; SYDER, A. J. et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. **Science**, v.309, n.5734, p.623-6, Jul. 2005.

LIPSCOMBE, R. J.; SUMIYA, M.; HILL, A. V. et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet**, v.1, n.9, p.709-15, Dec. 1992. Erratum in: *Hum. Mol. Genet.*, v.2, n.3, Mar. 1993.

LIPSCOMBE, R. J.; BEATTY, D. W.; GANCZAKOWSKI, M. et al. Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. **Eur J Hum Genet**, v.4, p.13-9, 1996.

LYRA, A. C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A. M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Braz J Med Biol Res**, v.37, n.5, p.691-5, May, 2004.

MAAS, J.; DE RODA HUSMAN, A.-M.; BROUWER, M. et al. FROM THE AMSTERDAM COHORT STUDY. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS: Amsterdam Cohort Study. **AIDS**, v.12, n.17, p.2275-80, Dec. 1998.

MACÍAS, J.; MELGUIZO, I.; FERNÁNDEZ-RIVERA, F. et al. Mortality due to liver failure and impact on survival of hepatitis virus infections in HIV-infected patients receiving potent antiretroviral therapy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.21, n.11, p.775-81, Nov. 2002.

MADSEN, H. O.; GARRED, P.; KURTZHALS, J. A. L. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, v.40, n.1, p.37-44, 1994.

MADSEN, H. O.; GARRED, P.; THIEL, S. et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **J Immunol**, v.155, n.6, p.3013-20, Sep. 1995.

MADSEN, H. O.; SATZ, M.L.; HOGH, B. et al. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. **J Immunol**, v.161, n.6, p.3169-75, Sep. 1998.

MANNS, M. P.; CORNBERG, M.; WEDEMEYER, H. Current and future treatment of hepatitis C. **Indian J Gastroenterol**, v.20, p.C47-51, Mar. 2001. (Suppl.1)

MARTELL, M.; ESTEBAN J. I.; QUER J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **J Virol**, v.66, n.5, p.3225-9, May. 1992.

MASSARD, J.; RATZIU, V.; THABUT, D. et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. **J Hepatol**, v.44, p.S19-24, 2006. (1 Suppl).

MATSUSHITA, M.; HIJIKATA, M.; OHTA, Y. et al. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. **Arch Virol**, v.143, p.645-51, 1998a.

MATSUSHITA, M.; HIJIKATA, M.; MATSUSHITA, M. et al. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. **J Hepatol**, v.29, n.5, p.695-700, Nov. 1998b.

McHUTCHISON, J. G. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **N Engl J Med**, v.339, n.21, p.1485-92, Nov. 1998.

McHUTCHISON, J. G. Hepatitis C advances in antiviral therapy: what is accepted treatment now? **J Gastroenterol Hepatol**, v.17, n.4, p.431-41, Apr. 2002.

McHUTCHISON, J. G. Understanding hepatitis C. **Am J Manag Care**, v.10, p.S21-9, Mar. 2004. (Suppl2)

MESSIAS-REASON, I.; SCHAFRANSKI, M. D.; JENSENIUS, J. C.; STEFFENSEN, R. The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. **Hum Immunol**, v.67, p.991-8, 2006.

MESSIAS-REASON, I.; BOLDT, A. B.; BRAGA, A. C. M. et al. The association of mannan-binding lectin gene polymorphism with clinical leprosy: new insight into an old paradigm. **J Infect Dis**, v.196, p.1379-1385, 2007.

MILLER, M. E.; SEALS, J.; KAYE, R.; LEVITSKY, L. C. A familial, plasma associated defect of phagocytosis: new cause of recurrent bacterial infection. **Lancet**, v.2, p.60-63, 1968.

MINCHINTON, R. M.; DEAN, M. M.; CLARK, T. R. et al. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. **S Cand J Immunol**, v.56, n.6, p.630-41, Dec. 2002.

MISSALE, G. BERTONI, R.; LAMONACA, V. et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. **J Clin Invest**, v.98, n.3, p.706-14, Aug. 1996.

MORADPOUR, D.; CERNY, A.; HEIM, M. H.; BLUM, H. E. Hepatitis C: an update. **Swiss Med Wkly**, v.131, n.21-22, p.291-8. Jun. 2001.

MORIYA, K.; FUJIE, H.; SHINTANI, Y. et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. **Nat Med**, v.4, n.9, p.1065-7, Sep. 1998.

MOUCARI, R.; RIPAULT, M. P.; OULES, V. et al. High predictive value of early viral kinetics in retreatment with peginterferon and ribavirin of chronic hepatitis C patients non-responders to standard combination therapy. **J Hepatol**, v.46, n.4, p.596-604, Apr. 2007.

MUIR, A. J.; PROVENZALE, D. A descriptive evaluation of eligibility for therapy among veterans with chronic hepatitis C virus infection. **J Clin Gastroenterol**, v.34, n.3, p.268-71, Mar. 2002.

NETH, O.; HANN, I.; TURNER, M. W.; KLEIN, N. J. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. **Lancet**, v.358, n.9282, p.614-8, Aug. 2001.

OGATA, N.; ALTER, H. J.; MILLER, R. H.; PURCELL, R. H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, v.88, n.8, p.3392-6, Apr. 1991.

PAWLOTSKY, J. M.; PELLERIN, M.; BOUVIER, M. et al. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. **J Med Virol**, v.54, n.4, p.256-64, Apr. 1998.

PEARLMAN, B. L. Hepatitis C treatment update. **Am J Med**, v.117, n.5, p.344-52, Sep. 2004.

PERZ, J. F.; ALTER, M. J. The coming wave of HCV-related liver disease: dilemmas and challenges. **J Hepatol**, v.44, n.3, p.441-3, Mar. 2006.

PETERS, M. G.; TERRAULT, N. A. Alcohol use and hepatitis C. **Hepatology**, v.36, n.5, p.S220-5, Nov. 2002. (Suppl 1)

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Mol Immunol**, v.38, n.2-3, p.133-49, Aug. 2001.

PETERSLUND, N. A.; KOCH, C.; JENSENIUS, J.; THIEL, S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. **Lancet**, v.358, n.9282, p.637-8, Aug. 2001. Comment in: **Lancet**, v.358, n.9282, p.598-9, Aug. 2001.

PICHE, T.; GELSI, E.; SCHNEIDER, S. M. et al. Fatigue is associated with high circulating leptin levels in chronic hepatitis C. **Gut**, v.51, n.3, p.434-9, Sep. 2002.

POYNARD, T.; MARCELLIN, P.; LEE, S.S. et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet**, v.352, n.9138, p.1426-32, Oct. 1998.

POYNARD, T.; CACOUB, P.; RATZIU, V. et al. FOR THE MULTIVIRC GROUP. Fatigue in patients with chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**, v.9, n.4, p.295-303, Jul. 2002.

PRINCE, A. M.; BROTMAN, B.; GRADY, G. F et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. **Lancet**, v.2, n.7875, p.241-6, Aug. 1974.

PROBST, C. M.; BOMPEIXE, E. P.; PEREIRA, N. F. et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Hum Biol**. 2000 Aug;72(4):597-617

PRODINGER, W. M.; WURZNER, R.; ERDEI, A.; DIERICH, M. P **Fundamental immunology**. 4.th. Philadelphia: Lippincott/ Raven, 1999.

PROHÁSZKA, Z.; TÓTH, F. D.; BÁNHEGYI, D.; FÜST, G. Role of Complement and Antibodies in the Control and Facilitation of HIV Disease. **Pathol Oncol Res**, v.3, n.4, p.296-302, 1997.

ROSEN, H. R. Hepatitis C pathogenesis: mechanisms of viral clearance and liver injury. **Liver Transpl**, v.9, n.11, p.S35-43, Nov. 2003.

ROUDOT-THORAVALL, F. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6,664 patients: the Study Group for the Prevalence and the Epidemiology of Hepatitis C Virus. **Hepatology**, v.26, n.2, p.485-90, Aug. 1997.

ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing heterozygote excess and deficiency. **Genetics**, v.140, n.4, p.1413-9, Aug. 1995.

SANTOS, I. K.; COSTA, C. H.; KRIEGER, H. et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.69, p.5212-5, 2001.

SASAKI, K.; TSUTSUMI, A.; WAKAMIYA, N. et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. **Scand J Gastroenterol**, v.35, n.9, p.960-5, Sep. 2000.

SASTRY, K.; HERMAN, G. A.; DAY, L. et al. The human mannose-binding protein gene-exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. **J Exp Med**, v.170, n.4, p.1175-1189, Oct. 1989.

SCHAFRANSKI, M. D.; STIER, A.; NISHIHARA, R.; MESSIAS-REASON, I. J. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. **Clin Exp Immunol**, v.138, p.521-5, 2004.

SCHEUER, P. J.; ASHRAFZADEH, P.; SHERLOCK, S. et al. The pathology of hepatitis C. **Hepatology**, v.15, n.4, p.567-71, Apr. 1992.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: a software for population genetic data analysis [computer program]. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.

SEEFF, L. B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.36, n.5, p.S35-46, Nov. 2002. (Suppl 1)

SEGAT, L. ; SILVA VASCONCELOS L. R.; MONTENEGRO DE MELO, F. et al . Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection. **Clin Immunol**, v.124, n.1, p.13-7, Jul. 2007.

SEN, G. C. Viruses and interferons. **Annu Rev Microbiol**, v.55, p.255-281, 2001.

SENALDI, G.; DAVIES, E. T.; MAHALINGAM, M. et al. Circulating levels of mannose binding protein in human immunodeficiency virus infection. **J Infect**, v.31, n.2, p.145-8, Sep. 1995.

SHARMA, P.; BALAN, V.; HERNANDEZ, J. et al. Hepatic steatosis in hepatitis C virus genotype 3 infection: does it correlate with body mass index, fibrosis, and HCV risk factors? **Dig Dis Sci**, v.49, n.1, p.25-9, Jan. 2004.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**, v.5, n.9, p.558-67, Sep. 2005.

SHIFFMAN, M. L. Pegylated interferons: what role will they play in the treatment of chronic hepatitis C? **Curr Gastroenterol Rep**, v.3, n.1, p.30-7, Feb. 2001.

SHUKLA, D. D.; HOYNE, P. A.; WARD, C. W. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. **Arch Virol**, v.140, p.1747-1761, 1995.

SIMMONDS, P.; HOLMES, E. C.; CHA, T.-A. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J Gen Virol**, v.74 (Pt 11), p.2391-9, Nov. 1993.

SKALNIKOVA, H.; FREIBERGER, T.; CHUMCHALOVA, J. et al. A. Cost-effective genotyping of human MBL2 gene mutations using multiplex PCR. **J Immunol Methods**, v.295, n.1-2, p.139-47, Dec. 2004.

SOBORG, C.; MADSEN, H. O.; ANDERSEN, A. B. et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. **J Infect Dis**, v.188, n.5, p.777-82, Sep. 2003.

SOMI, M. H.; FARHANG, S.; ASGHARZADEH, M. et al. Mannose Binding Lectin Gene Haplotype in Iranian Patients with Hepatitis C Infection. **Hepatitis Monthly**, v.7, n.1, p.21-26, 2007.

SPADA, E.; MELE, A.; CICCOCCHI, M. et al. Changing epidemiology of parenterally transmitted viral hepatitis: results from the hepatitis surveillance system in Italy. **Dig Liver Dis**, v.33, n.9, p.778-84, Dec. 2001.

STANLEY M. L. TLRs and RIG-I Signaling in Hepatitis C. In: BASIC RESEARCH WORKSHOP – PATHOGEN RECOGNITION RECEPTORS IN LIVER DISEASE –AASLD. **Proceeding's...** [S. I.]: Basic Research Workshop-AASLD, 2006.

STEFFENSEN, R.; THIEL, S.; VARMING, K. et al. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific Primers. **J Immunol Methods**, v.241, n.1-2, p.33-42, Jul. 2000.

STEFFENSEN, R.; HOFFMANN, K.; VARMING, K. Rapid genotyping of MBL2 gene mutations using real-time PCR with fluorescent hybridisation probes. **J Immunol Methods**, v.278, n.1-2, p.191-9, Jul. 2003.

SUMIYA, M.; SUPER, M.; TABONA, P. et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, v.337, n.8757, p.1569-70, Jun. 1991.

SUMMERFIELD, J. A.; SUMIYA, M.; LEVIN, M.; TURNER, M. W. Association of mutations in mannanose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **BMJ**, v.314, n.7089, p.1229-32, Apr. 1997.

SUPER, M.; THIEL, S.; LU, J. et al. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. **Lancet**, v.2, n.8674, p.1236-9, Nov. 1989.

TAKAHASHI, K.; EDDIE IP, W. K.; MICHELOW, I. C.; EZEKOWITZ, R. A. B. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. **Current Opinion in Immunology**, v.18, p.16-23, 2006.

TAKAKI, A. WIESE, M.; MAERTENS, G. et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. **Nat Med**, v.6, n.5, p.578-82, May 2000.

- TAKAMIZAWA, A.; MORI, C.; FUKU, I. et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **J Virol**, v.65, n.3, p.1105-13, Mar. 1991.
- TANAKA, H.; TSUKUMA, H.; YAMANO, H. et al. Hepatitis C virus 1b(II) infection and development of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. **J Epidemiol**, v.8, n.4, p.244-9, Oct. 1998.
- TAYLOR, M. E.; BRICKELL, P. M.; CRAIG, R. K. ; SUMMERFIELD, J. A. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. **Biochem J**, v.262, n.3, p.763-71, Sep. 1989.
- TERAI, I.; KOBAYASHI, K.; MATSUSHITA, M. et al. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. **Eur J Immunol**, v.33, n.10, p.2755-63, 2003.
- TERRAULT, N. A. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. **Hepatology**, v.36, n.5, p.S99-105, Nov. 2002. (Suppl 1)
- THIEL, S.; FREDERIKSEN, P. D.; JENSENIUS, J. C. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. **Mol Immunol**, v.43, n.1-2, p.86-96, Jan. 2006.
- THIO, C. L.; MOSBRUGER, T.; ASTEMBORSKI, J. et al. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. **J Virol**, v.79, n.14, p.9192-6, Jul. 2005.
- THOMSON, M.; NASCIMBENI, M.; HAVERT, M. B. et al. The clearance of hepatitis C virus infection in chimpanzees may not necessarily correlate with the appearance of acquired immunity. **J Virol**, v.77, n.2, p.862-70, Jan. 2003.
- TSUKIYAMA-KOHARA, K.; IIZUKA, N.; KOHARA, M.; NOMOTO, A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. **J Virol**, v.66, n.3, p.1476-83, Mar. 1992.
- TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**, v.17, n.11, p.532-40, Nov. 1996.
- TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Mol Immunol**, v.40, n.7, p.423-9, Nov. 2003.
- TURNER, M. W.; MOWBRAY, J. F.; ROBERTON, D. R. A study of C3b deposition on yeast surfaces by sera of known opsonic potential. **Clin Exp Immunol**, v.46, p.412-419, 1981.
- TURNER, M. W.; DINAN, L.; HEATLEY, S. et al. Restricted polymorphism of the mannose-binding lectin gene of indigenous Australians. **Hum Mol Genet**, v.9, n.10, p.1481-6, Jun. 2000.
- UTIYAMA, S.; MESSIAS-REASON, I.; KOTZE L. The complement System in Diseases: Genetic and Pathogeny. **Rev Bras Reumatol**, v. 44, n. 4, p. 277-86, jul/ago., 2004a
- UTIYAMA, S.; MESSIAS-REASON, I.; KOTZE L. Conceitos atuais na ativação do sistema complemento e suas propriedades biológicas. **RBAC**, v.36, n.3, p.183-88, 2004b
- VALDIMARSSON, H. Infusion of plasma-derived mannan-binding lectin (MBL) into MBL-deficient humans. **Biochem Soc Trans**, v.31(Pt 4), p.768-9, Aug. 2003.

VALDIMARSSON, H.; STEFANSSON, M.; VIKINGSDDOTTIR, T. et al. Free content reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. **Scand J Immunol**, v.48, n.2, p.116-23, Aug. 1998.

VALDIMARSSON, H.; VIKINGSDDOTTIR, T.; BANG, P. et al. Human plasma-derived mannan-binding lectin: a phase I safety and pharmacokinetic study. **Scand J Immunol**, v.59, n.1, p.97-102, Jan. 2004.

VANDELLI, C.; RENZO F.; ROMANO, L. et al. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. **Am J Gastroenterol**, v.99, n.5, p.855-9, May 2004.

WAKITA, T.; PIETSCHMANN, T.; KATO, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat Med**, v.11, n.7, p.791-6, Jul. 2005.

WALSH, M. C.; BOURCIER, T.; TAKAHASHI, K. et al. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. **J Immunol**, v.175, n. , p.541-6, Jul. 2005.

WASLEY, A.; ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Semin Liver Dis**, v.20, p.1-16, 2000.

WEINER, A. J.; CHRISTOPHERSON, C. ; HALL, J. E. et al. Sequence variation in hepatitis C viral isolates. **J Hepatol**, v.13; S6-14, 1991. (Suppl 4)

WONG, J. B.; DAVIS, G.L.; MCHUTCHISON, J. G. et al. INTERNATIONAL HEPATITIS INTERVENTIONAL THERAPY GROUP. Economic and clinical effects of evaluating rapid viral response to peginterferon alfa-2b plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. **Am J Gastroenterol**, v.98, n.11, p.2354-62, Nov. 2003.

WORTHLEY, D. L.; BARDY, P. G.; MULLIGHAN, C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. **Intern Med J**, v.35, n.9, p.548-55, Sep. 2005.

XIA, G. L.; LIU, C. B.; CAO, H. L. et al. Prevalence of hepatitis B and C virus infections in the general population: results from a nationwide cross-sectional seroepidemiologic study of hepatitis A, B, C, D and E virus infections in China, 1992. **International Hepatology Communications**, v.5, p.62-73, 1996.

YUEN, M. F.; LAU, C. S.; LAU, Y. L. et al. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. **Hepatology**, v.29, n.4, p.1248-51, Apr. 1999.

ZARSKI, J. P.; BOHN, B.; BASTIE, A. et al. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. **J Hepatol**, v.28, n.1, p.27-33, Jan. 1998.

ZEN, C. H. **Influência do polimorfismo gênico da lectina ligante de manose na susceptibilidade à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ZHONG, J.; GASTAMINZA, P.; CHENG, G. et al. . Robust hepatitis C virus infection in vitro. **Proc Natl Acad Sci (USA.)**, v.102, n.26, p.9294-9, Jun. 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 **ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS *MBL2***

HAPLÓTIPO	PACIENTES		CONTROLES	
	Freq.	s.d.	Freq.	s.d.
HYP A	0.2794	0,0315	0.2647	0,0310
HYP D	0,0490	0,0152	0,0490	0,0152
LXP A	0.2157	0,0289	0.2108	0,0286
LYP A	0.1029	0,0213	0,0931	0,0204
LYP B	0.1422	0,0245	0.1520	0,0252
LYP D			0,0049	0,0049
LYQ A	0.1814	0,0270	0.2108	0,0286
LYQ C	0,0294	0,0119	0,0147	0,0084

NOTA: Freq. = frequência; s.d. = desvio padrão.

APÊNDICE 2

EQUILÍBRIO HARDY-WEINBERG

GENÓTIPOS	PACIENTES				CONTROLES			
	Obs. Het.	Exp. Het.	P-value	s.d.	Obs. Het.	Exp. Het.	P-value	s.d.
H/L	0,44118	0,44330	1,00000	0,00000	0,39216	0,43272	0,35828	0,00156
X/Y	0,31373	0,34000	0,55244	0,00162	0,30392	0,33435	0,37151	0,00153
P/Q	0,28431	0,33435	0,13952	0,00103	0,33333	0,35101	0,58170	0,00154
A/O	0,40196	0,37086	0,32106	0,00153	0,30392	0,36811	0,04704	0,00060
TOTAL ⁽¹⁾			0,546+/-	0,001			0,116+/-	0,001

NOTA: Obs. Het. = Heterozigose observada; Exp. Het. = Heterozigose esperada; s.d. = desvio padrão.

(1) Markov Chain test.

APÊNDICE 3

PLANILHA COM RESULTADOS DOS PACIENTES

continua

N.º	NOME	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE 31/3/2005	Exon1	H/L	X/Y	P/Q	Conc.	XA/XA	XA/YA	YA/YA	XA/YO	YO/YO	YA/YO	GENÓTIPO VHC	FIBROSE	IFN		IFNpeg	
																		IFN	RS	IFNpeg	RS
1	ACM	M	Br	44,2	AB	LL	XY	PP	11	-	-	-	S	-	-	1	4	S	N	N	-
3	AM	M	Br	44,0	AA	HL	YY	PQ	2.346	-	-	S	-	-	-	3	2	S	S	N	-
4	ABN	M	Br	64,0	AA	HH	YY	PP	5.594	-	-	S	-	-	-	1	4	S	N	S	S
5	ACA	M	Br	39,8	AA	HL	YY	PQ	3.605	-	-	S	-	-	-	1	4	N	-	S	N
6	AMTS	F	Br	55,2	AA	HL	XY	PP	479	-	S	-	-	-	-	3	3	S	S	N	-
7	AFS	M	Br	64,4	AA	LL	XY	PP	2.832	-	S	-	-	-	-	3	4	S	N	N	-
8	APPK	F	Br	49,5	AB	LL	XY	PP	<10	-	-	-	S	-	-	1	3	S	S	N	-
9	ARS	M	Br	49,3	AA	LL	XY	PP	1.188	-	S	-	-	-	-	3	3	S	N	N	-
10	CGG	M	Br	44,6	AD	HL	XY	PP	835	-	-	-	S	-	-	1	2	S	N	N	-
11	CLS	M	Br	47,5	AA	HL	XY	PP	3.114	-	S	-	-	-	-	3	4	N	-	N	-
13	CAPN	M	Br	65,0	AA	LL	XY	PQ	3.678	-	S	-	-	-	-	1	2	N	-	S	-
14	CJS	M	Br	45,5	AA	HL	YY	PP	3.488	-	-	S	-	-	-	3	3	S	N	S	S
15	CFD	F	Br	59,0	AB	LL	YY	PQ	371	-	-	-	-	-	S	1	3	S	N	S	N
16	DRN	F	Br	41,7	AA	HL	YY	PP	999	-	-	S	-	-	-	1	4	N	-	S	-
18	DRC	M	Br	56,7	AD	HL	XY	PP	-	-	-	-	S	-	-	1	3	S	N	N	-
19	DASR	M	Br	33,6	AA	HL	YY	PQ	2.800	-	-	S	-	-	-	3	2	S	S	N	-
20	DVN	F	Br	44,9	AB	HL	YY	PP	416	-	-	-	-	-	S	3	3	S	N	N	-
21	DFS	M	Br	59,7	AA	LL	YY	PP	2.413	-	-	S	-	-	-	3	4	N	-	N	-
22	DG	M	Br	61,5	AB	LL	XY	PP	97	-	-	-	S	-	-	1	4	N	-	S	N
23	ELM	M	Br	38,1	AA	HL	YY	PP	-	-	-	S	-	-	-	3	2	N	-	S	S
24	EGA	M	Br	50,7	AA	HL	XY	PP	818	-	S	-	-	-	-	3	3	S	N	N	-
25	EJC	M	Br	28,8	AA	HL	XY	PP	1.469	-	S	-	-	-	-	1	2	N	-	S	S
26	EFSR	F	Br	66,8	AB	LL	YY	PP	266	-	-	-	-	-	S	3	4	S	S	N	-
27	ECC	M	Br	40,1	AB	LL	YY	PQ	368	-	-	-	-	-	S	-	4	S	S	N	-
28	ELC	F	Br	53,8	AC	LL	XY	PQ	17	-	-	-	S	-	-	1	2	S	N	N	-

continua

N.º	NOME	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE 31/3/2005	Exon1	H/L	X/Y	P/Q	Conc.	XA/XA	XA/YA	YA/YA	XA/YO	YO/YO	YA/YO	GENÓTIPO VHC	FIBROSE	IFN		IFNpeg	
29	FHG	M	Br	28,4	AA	HL	XY	PP	4.059	-	S	-	-	-	-	3	2	S	N	N	-
30	FDC	M	Br	52,6	AD	HH	YY	PP	2.713	-	-	-	-	-	S	1	4	N	-	S	N
31	GOA	M	Br	49,5	AA	LL	XY	PP	527	-	S	-	-	-	-	3	3	N	-	S	S
32	HZ	M	Br	56,3	AA	LL	YY	PQ	1.738	-	-	S	-	-	-	1	3	N	-	S	N
33	IIF	M	Br	39,2	AB	LL	XY	PP	<10	-	-	-	S	-	-	3	2	N	-	S	S
34	IVFN	F	Br	59,1	AA	HL	YY	PQ	1.298	-	-	S	-	-	-	1	3	S	N	S	S
35	IT	M	Br	64,1	AA	LL	XY	PQ	823	-	S	-	-	-	-	1	4	S	N	S	N
36	JC	M	Br	48,1	AB	LL	YY	PQ	386	-	-	-	-	-	S	3	3	S	-	N	-
37	JJPV	M	Br	46,3	BB	LL	YY	PP	<10	-	-	-	-	S	-	3	2	N	-	S	N
38	JK	F	Br	59,0	AA	HH	YY	PP	1.282	-	-	S	-	-	-	1	2	N	-	S	N
39	JMJPA	F	Br	49,6	AD	HH	YY	PP	-	-	-	-	-	-	S	3	4	S	N	S	N
40	JCAC	M	Br	41,6	AB	LL	YY	PP	-	-	-	-	-	-	S	3	3	S	S	N	-
41	JCE	M	Br	51,8	AA	HL	XY	PP	-	-	S	-	-	-	-	1	4	N	-	S	N
42	JS	M	Br	67,1	AA	HL	YY	PP	-	-	-	S	-	-	-	1	4	N	-	N	-
43	JEM	M	Br	49,6	AA	HL	XY	PP	-	-	S	-	-	-	-	3	4	S	S	N	-
44	JMR	M	Br	45,2	DD	HH	YY	PP	-	-	-	-	-	S	-	3	3	S	S	N	-
45	JGP	M	Br	44,1	AB	LL	XY	PP	92	-	-	-	S	-	-	3	3	S	N	N	-
46	JHM	M	Br	48,6	AB	LL	YY	PP	-	-	-	-	-	-	S	3	3	S	S	N	-
47	JES	M	Br	68,8	AB	LL	YY	PP	221	-	-	-	-	-	S	1	2	S	N	N	-
48	JCS	M	Br	37,4	AB	HL	YY	PP	504	-	-	-	-	-	S	3	3	S	S	N	-
49	KB	F	Br	43,2	AA	HL	XY	PP	1.252	-	S	-	-	-	-	3	3	S	S	N	-
50	LCCS	M	Br	52,4	AA	LL	YY	PQ	1.374	-	-	S	-	-	-	-	4	N	-	N	-
51	LCZ	M	Br	52,2	AB	HL	YY	PP	-	-	-	-	-	-	S	3	4	S	S	N	-
52	LEHL	M	Br	46,0	AA	HH	YY	PP	5.286	-	-	S	-	-	-	3	3	S	N	S	N
53	LB	F	Br	64,6	AD	HH	YY	PP	1.426	-	-	-	-	-	S	1	2	N	-	N	-
54	LBS	F	Br	67,3	AA	HL	XY	PP	1.689	-	S	-	-	-	-	3	3	S	N	N	-
55	MMSBSO	M	Br	43,2	AA	HH	YY	PP	1.866	-	-	S	-	-	-	2	3	S	S	N	-
56	MAL	F	Br	53,3	AA	HL	YY	PQ	-	-	-	S	-	-	-	-	3	S	S	N	-
57	MBF	F	Br	54,1	AA	HH	YY	PP	2.408	-	-	S	-	-	-	1	2	N	-	S	S
58	MLML	F	Br	39,2	AA	LL	XX	PP	1.388	S	-	-	-	-	-	3	3	S	N	N	-
59	MLP	F	Br	55,9	AB	LL	YY	PQ	-	-	-	-	-	-	S	3	4	S	N	S	N
60	MLGT	F	Br	69,6	AA	HL	YY	PQ	3.917	-	-	S	-	-	-	1	4	N	-	S	S

continua

N.º	NOME	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE 31/3/2005	Exon1	H/L	X/Y	P/Q	Conc.	XA/XA	XA/YA	YA/YA	XA/YO	YO/YO	YA/YO	GENÓTIPO VHC	FIBROSE	IFN		IFNpeg	
61	MCRS	F	Br	50,5	AC	LL	YY	QQ	351	-	-	-	-	-	S	3	4	S	N	N	-
62	MRP	F	Br	67,2	AA	HL	XY	PP	-	-	S	-	-	-	-	1	3	S	N	N	-
63	MFFS	F	Br	60,4	AA	LL	YY	PQ	3.447	-	-	S	-	-	-	3	2	S	S	N	-
64	M LS	F	Br	41,0	AA	HL	YY	PQ	-	-	-	S	-	-	-	3	2	S	S	N	-
65	MDM	M	Br	44,5	AB	LL	YY	PQ	454	-	-	-	-	-	S	1	2	N	-	S	N
66	MVC	F	Br	47,2	AB	LL	YY	PQ	202	-	-	-	-	-	S	3	4	N	-	N	-
67	MJR	M	Br	55,1	AA	HL	XY	PP	2.416	-	S	-	-	-	-	3	4	N	-	N	-
68	NSF	M	Br	50,0	AD	HL	YY	PP	855	-	-	-	-	-	S	1	3	N	-	S	-
69	NC M	M	Br	57,9	AB	HL	YY	PP	729	-	-	-	-	-	S	3	3	N	-	S	N
70	NHS	M	Br	53,3	AA	HL	YY	PQ	2.684	-	-	S	-	-	-	1	4	S	N	N	-
71	NCBD	F	Br	54,1	AA	HH	YY	PP	2.422	-	-	S	-	-	-	3	3	S	-	N	-
72	NLT	M	Br	47,1	AA	HL	YY	PQ	481	-	-	S	-	-	-	-	4	S	S	N	-
73	NCM	F	Br	45,2	AA	LL	XX	PP	367	S	-	-	-	-	-	-	2	S	S	N	-
74	OSL	F	Br	66,4	AA	LL	XY	PQ	1.316	-	S	-	-	-	-	1	3	N	-	S	N
75	ONC	M	Br	53,0	AB	HL	YY	PP	256	-	-	-	-	-	S	3	4	S	N	S	N
76	OP	M	Br	47,1	AA	HL	YY	PQ	-	-	-	S	-	-	-	1	3	N	-	S	N
77	OIM	F	Br	48,5	AA	LL	XX	PP	479	S	-	-	-	-	-	-	2	S	S	N	-
79	PS	M	Br	32,3	AA	LL	YY	QQ	-	-	-	S	-	-	-	-	4	S	S	N	-
80	PAC	M	Br	47,7	AA	LL	XY	PP	1.875	-	S	-	-	-	-	1	2	S	N	N	-
81	RLP	M	Br	55,3	AA	HL	XY	PP	1.415	-	S	-	-	-	-	1	4	N	-	N	-
82	RMC	F	Br	45,6	AC	LL	YY	QQ	304	-	-	-	-	-	S	3	3	S	N	N	-
83	RGS	F	Br	54,7	AA	LL	YY	QQ	1.277	-	-	S	-	-	-	3	4	S	N	N	-
84	RLSN	F	Br	32,5	AC	LL	YY	QQ	515	-	-	-	-	-	S	1	4	N	-	S	N
85	RLF	M	Br	37,9	AB	HL	YY	PP	183	-	-	-	-	-	S	1	4	N	-	S	-
86	REK	M	Br	62,9	AB	LL	XY	PP	51	-	-	-	S	-	-	1	4	N	-	S	N
87	RFF	M	Br	44,7	AA	LL	XY	PQ	2.242	-	S	-	-	-	-	3	4	S	S	N	-
88	RLS	M	Br	47,7	AC	LL	YY	QQ	352	-	-	-	-	-	S	1	4	N	-	S	N
89	RSB	M	Br	66,5	AA	LL	XX	PP	36	S	-	-	-	-	-	1	3	S	S	N	-
90	RC	F	Br	58,4	AB	HL	YY	PP	393	-	-	-	-	-	S	3	4	N	-	S	S
91	RL	F	Br	63,1	AA	HL	YY	PQ	3.332	-	-	S	-	-	-	1	3	N	-	S	N
92	RB	M	Br	55,3	AA	HL	YY	PP	-	-	-	S	-	-	-	3	4	S	N	S	S
93	SLCi	M	Br	41,9	AA	HL	YY	PP	724	-	-	S	-	-	-	3	4	S	S	N	-

conclusão

N.º	NOME	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE 31/3/2005	Exon1	H/L	X/Y	P/Q	Conc.	XA/XA	XA/YA	YA/YA	XA/YO	YO/YO	YA/YO	GENÓTIPO VHC	FIBROSE	IFN		IFNpeg	
94	SRS	F	Br	51,5	AD	HL	YY	PP	617	-	-	-	-	-	S	3	4	S	S	N	-
95	SRA	F	Br	54,3	AA	LL	XX	PP	297	S	-	-	-	-	-	3	3	S	S	N	-
96	TJ M	F	Br	46,5	AB	LL	YY	PQ	260	-	-	-	-	-	S	1	3	S	N	N	-
98	UOP	M	Br	50,8	AA	LL	XY	PQ	1.374	-	S	-	-	-	-	1	4	N	-	S	N
99	VRJ	M	Br	37,7	AA	LL	YY	QQ	3.194	-	-	S	-	-	-	1	3	N	-	S	S
100	VK	M	Br	48,3	AA	HL	XY	PP	3.819	-	S	-	-	-	-	1	4	N	-	S	N
101	VP	M	Br	53,7	AD	HH	YY	PP	837	-	-	-	-	-	S	3	3	S	N	S	S
102	VNi	F	Br	55,6	AB	HL	YY	PP	359	-	-	-	-	-	S	1	2	S	N	S	N
103	VSM	M	Br	59,6	AB	HL	YY	PP	-	-	-	-	-	-	S	1	4	N	-	S	N
104	WD	M	Br	61,5	AA	LL	XX	PP	538	S	-	-	-	-	-	1	4	S	N	N	-
105	YLS	F	Br	48,0	AC	HL	YY	PQ	370	-	-	-	-	-	S	3	4	S	S	N	-
106	ZKi	M	Br	63,3	AA	HL	XY	PP	1.869	-	S	-	-	-	-	3	4	S	-	N	-
107	ZON	M	Br	35,5	AB	LL	YY	PQ	107	-	-	-	-	-	S	3	4	S	N	N	-

NOTA: Br = branca; S = sim; N = não; M = masculino; F = feminino; Conc. = concentração.

APÊNDICE 4

PLANILHA COM RESULTADOS DOS CONTROLES

continua

N.º	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE 31/3/2005	EXON	H/L	X/Y	P/Q	GENÓTIPO		CONC.	XA/XA	XA/YA	YA/YA	XA/YO	YO/YO	YA/YO
323	M	Br	45,8	AB	LL	XY	PP	LYPB / LXPA	yo/xa	47	-	-	-	S	-	-
298	M	Br	48,5	AC	HL	YY	PQ	LYQC / HYPA	yo/ya	97	-	-	-	-	-	S
338	M	Br	47,6	AB	LL	YY	PQ	LYPB / LYQA	yo/ya	124	-	-	-	-	-	S
305	M	Br	49,5	AB	LL	YY	PQ	LYPB / LYQA	yo/ya	181	-	-	-	-	-	S
280	M	Br	47,5	AA	LL	XX	PP	LXPA / LXPA	xa/xa	195	S	-	-	-	-	-
1	F	Br	41,3	AA	HL	YY	PQ	HYPA / LYPB	ya/ya	280	-	-	S	-	-	-
359	M	Br	51,9	AA	HL	YY	PQ	LYQA / HYPA	ya/ya	289	-	-	S	-	-	-
263	M	Br	62,5	AB	HL	YY	PP	LYPB / HYPA	yo/ya	308	-	-	-	-	-	S
254	M	Br	48,4	AA	LL	XX	PP	LXPA / LXPA	xa/xa	363	S	-	-	-	-	-
30	F	Br	62,3	AB	HL	YY	PP	LYPB / HYPA	yo/ya	370	-	-	-	-	-	S
25	F	Br	52,3	AB	LL	YY	PQ	LYPB / LYQA	yo/ya	400	-	-	-	-	-	S
6	M	Br	53,3	AA	LL	YY	PP	LYPA / LYPB	ya/ya	480	-	-	S	-	-	-
197	F	Br	66,6	AA	LL	XY	PQ	LXPA / LYQA	xa/ya	513	-	S	-	-	-	-
19	F	Br	63,3	AB	HL	YY	PP	HYPA / LYPB	ya/yo	640	-	-	-	-	-	S
31	F	Br	42,3	AD	HL	YY	PQ	HYPD / LYQA	yo/ya	650	-	-	-	-	-	S
311	M	Br	59,3	AA	HL	XY	PP	LXPA / HYPA	xa/ya	680	-	S	-	-	-	-
358	M	Br	52,3	AA	LL	XY	PQ	LXPA / LYQA	xa/ya	790	-	S	-	-	-	-
306	M	Br	49,9	AA	HL	XY	PP	LXPA / HYPA	xa/ya	854	-	S	-	-	-	-
218	F	Br	54,5	AA	LL	XY	PQ	LXPA / LYQA	xa/ya	855	-	S	-	-	-	-
292	M	Br	55,7	AA	LL	XY	PQ	LXPA / LYQA	xa/ya	915	-	S	-	-	-	-
22	F	Br	51,3	AB	HL	YY	PP	LYPB / HYPA	yo/ya	1.100	-	-	-	-	-	S
324	M	Br	50,6	AA	LL	YY	QQ	LYQA / LYPB	ya/ya	1.132	-	-	S	-	-	-
348	M	Br	56,3	AA	HH	YY	PP	HYPA / HYPA	ya/ya	1.279	-	-	S	-	-	-
296	M	Br	52,3	AD	LL	YY	PP	LYPA / LYPD	ya/yo	1.326	-	-	-	-	-	S
259	M	Br	44,6	AA	HL	XY	PP	LXPA / HYPA	xa/ya	1.381	-	S	-	-	-	-

continua

N.º	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE 31/3/2005	EXON	H/L	X/Y	P/Q	GENÓTIPO		CONC.	XA/XA	XA/YA	YA/YA	XA/YO	YO/YO	YA/YO
360	M	Br	46,3	AA	LL	YY	PQ	LYQA / LYPA	ya/ya	1.392	-	-	S	-	-	-
5	M	Br	72,3	AB	HL	YY	PP	LYPB / HYPB	yo/ya	1.400	-	-	-	-	-	S
209	F	Br	52,0	AA	HL	YY	PQ	LYQA / HYPB	ya/ya	1.508	-	-	S	-	-	-
27	F	Br	66,3	AA	LL	XY	PP	LXPA / LYPA	xa/ya	1.700	-	S	-	-	-	-
226	F	Br	46,2	AA	LL	YY	QQ	LYQA / LYPA	ya/ya	1.797	-	-	S	-	-	-
213	F	Br	57,7	AA	LL	YY	QQ	LYQA / LYPA	ya/ya	1.806	-	-	S	-	-	-
366	M	Br	50,5	AA	LL	YY	QQ	LYQA / LYPA	ya/ya	2.087	-	-	S	-	-	-
299	M	Br	64,9	AA	LL	YY	QQ	LYQA / LYPA	ya/ya	2.100	-	-	S	-	-	-
300	M	Br	62,4	AA	HL	YY	PQ	LYQA / HYPB	ya/ya	2.205	-	-	S	-	-	-
270	M	Br	63,6	AA	HL	XY	PP	LXPA / HYPB	xa/ya	2.333	-	S	-	-	-	-
28	F	Br	70,3	AA	LL	YY	PQ	LYQA / LYPA	ya/ya	2.500	-	-	S	-	-	-
36	F	Br	39,3	AA	LL	XY	PQ	LXPA / LYQA	xa/ya	2.500	-	S	-	-	-	-
26	F	Br	53,3	AA	LL	XY	PQ	LXPA / LYQA	xa/ya	2.600	-	S	-	-	-	-
367	M	Br	47,3	AA	HH	YY	PP	HYPB / HYPB	ya/ya	2.780	-	-	S	-	-	-
34	F	Br	51,3	AA	HH	YY	PP	HYPB / HYPB	ya/ya	2.800	-	-	S	-	-	-
361	M	Br	58,5	AA	HL	YY	PP	LYPA / HYPB	ya/ya	2.809	-	-	S	-	-	-
289	M	Br	44,6	AA	HL	YY	PQ	LYQA / HYPB	ya/ya	2.866	-	-	S	-	-	-
10	M	Br	39,3	AD	HH	YY	PP	HYPD / HYPB	yo/ya	3.100	-	-	-	-	-	S
38	F	Br	54,3	AA	HH	YY	PP	HYPB / HYPB	ya/ya	3.200	-	-	S	-	-	-
309	M	Br	54,7	AA	HL	YY	PP	LYPA / HYPB	ya/ya	3.638	-	-	S	-	-	-
364	M	Br	58,8	AA	HL	YY	PQ	LYQA / HYPB	ya/ya	5.023	-	-	S	-	-	-
20	F	Br	43,3	AB	LL	XY	PP	LYPB / LXPA	yo/xa	-	-	-	-	S	-	-
24	F	Br	57,3	BC	LL	YY	PQ	LYQC / LYPB	yo/yo	-	-	-	-	-	S	-
47	F	Br	42,6	BD	HL	YY	PP	HYPD / LYPB	yo/yo	-	-	-	-	-	S	-
48	F	Br	42,8	AA	LL	XY	PQ	LXPA / LYQA	xa/ya	-	-	S	-	-	-	-
50	M	Br	61,2	AB	LL	YY	PQ	LYPB / LYQA	yo/ya	-	-	-	-	-	-	S
51	F	Br	44,1	AA	LL	XY	PQ	LXPA / LYQA	xa/ya	-	-	S	-	-	-	-
54	M	Br	28,5	AA	HH	YY	PP	HYPB / HYPB	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
57	F	Br	44,5	AA	LL	XY	PP	LXPA / LYPA	xa/ya	-	-	S	-	-	-	-
58	F	Br	40,7	AA	HH	YY	PP	HYPB / HYPB	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
63	M	Br	59,3	AA	HL	YY	PQ	HYPB / LYPA	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-

continua

N.º	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE 31/3/2005	EXON	H/L	X/Y	P/Q	GENÓTIPO		CONC.	XA/XA	XA/YA	YA/YA	XA/YO	YO/YO	YA/YO
70	M	Br	37,6	AA	HL	YY	PP	HYP A / LYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
78	F	Br	42,1	AA	LL	YY	PP	LYP A / LYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
81	M	Br	44,7	AB	LL	XY	PP	LXP A / LYP B	xa/yo	-	-	-	-	S	-	-
84	F	Br	52,9	AA	LL	XX	PP	LXP A / LXP A	xa/xa	-	S	-	-	-	-	-
94	F	Br	55,4	AB	LL	XY	PP	LXP A / LYP B	xa/yo	-	-	-	-	S	-	-
95	F	Br	47,0	AB	LL	XY	PP	LXP A / LYP B	xa/yo	-	-	-	-	S	-	-
96	M	Br	48,3	AA	HL	XY	PP	LXP A / HYP A	xa/ya	-	-	S	-	-	-	-
97	M	Br	57,4	AA	HL	YY	PQ	HYP A / LYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
98	M	Br	28,7	AA	HL	YY	PP	HYP A / LYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
100	M	Br	37,6	AA	HL	YY	PQ	HYP A / LYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
101	F	Br	60,6	BB	LL	YY	PP	LYP B / LYP B	yo/yo	-	-	-	-	-	S	-
102	F	Br	43,8	AB	HL	YY	PP	LYP B / HYP A	yo/ya	-	-	-	-	-	-	S
103	M	Br	53,8	AA	HL	YY	PQ	HYP A / LYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
118	M	Br	49,6	AA	HL	YY	PP	LYP A / HYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
119	M	Br	41,8	AA	HH	YY	PP	HYP A / HYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
122	F	Br	44,1	BB	LL	YY	PP	LYP B / LYP B	yo/yo	-	-	-	-	-	S	-
126	F	Br	42,4	AB	HL	YY	PP	LYP B / HYP A	yo/ya	-	-	-	-	-	-	S
145	M	Br	32,7	AB	LL	XY	PP	LXP A / LYP B	xa/yo	-	-	-	-	S	-	-
152	M	Br	63,3	AA	LL	XY	PP	LXP A / LYP A	xa/ya	-	-	S	-	-	-	-
156	F	Br	53,2	AA	LL	YY	PQ	LYP A / LYQ A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
169	F	Br	48,2	AC	LL	XY	PQ	LXP A / LYQ C	xa/yo	-	-	-	-	S	-	-
173	F	Br	43,6	AB	LL	XY	PP	LXP A / LYP B	xa/yo	-	-	-	-	S	-	-
175	M	Br	33,4	AA	HL	YY	PP	HYP A / LXP A	ya/xa	-	-	S	-	-	-	-
176	M	Br	35,5	AA	LL	XX	PP	LXP A / LXP A	xa/xa	-	S	-	-	-	-	-
180	F	Br	53,2	AA	LL	YY	QQ	LYQ A / LYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
184	M	Br	39,7	DD	HH	YY	PP	HYP D / HYP D	yo/yo	<10	-	-	-	-	S	-
206	F	Br	32,6	AA	LL	YY	PQ	LYQ A / LYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
210	M	Br	53,4	DD	HH	YY	PP	HYP D / HYP D	yo/yo	<10	-	-	-	-	S	-
216	M	Br	44,0	AD	HL	XY	PP	HYP D / LXP A	yo/xa	-	-	-	-	S	-	-
228	M	Br	37,6	AA	LL	XY	PP	LXP A / LYP A	xa/ya	-	-	S	-	-	-	-
229	M	Br	47,1	AA	HH	YY	PP	HYP A / HYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-

conclusão

N.º	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE 31/3/2005	EXON	H/L	X/Y	P/Q	GENÓTIPO		CONC.	XA/XA	XA/YA	YA/YA	XA/YO	YO/YO	YA/YO
284	M	Br	47,5	BB	LL	YY	PP	LYPB / LYPB	yo/yo	<10	-	-	-	-	S	-
285	M	Br	40,3	AA	HH	YY	PP	HYP A / HYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
291	M	Br	59,6	BB	LL	YY	PP	LYPB / LYPB	yo/yo	<10	-	-	-	-	S	-
294	M	Br	45,2	AB	HL	YY	PP	LYPB / HYP A	yo/ya	-	-	-	-	-	-	S
310	M	Br	65,3	AA	HL	YY	PQ	LYQA / HYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
317	M	Br	56,6	AD	HL	XY	PP	HYPD / LXPA	yo/xa	<10	-	-	-	S	-	-
319	M	Br	43,3	AA	HL	YY	PQ	LYQA / HYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-
328	M	Br	44,1	AA	HL	XY	PP	LXPA / HYP A	xa/ya	-	-	S	-	-	-	-
329	M	Br	44,3	AA	LL	XX	PP	LXPA / LXPA	xa/xa	-	S	-	-	-	-	-
331	M	Br	52,8	AA	LL	XX	PP	LXPA / LXPA	xa/xa	-	S	-	-	-	-	-
342	M	Br	41,9	AA	HL	XY	PP	LXPA / HYP A	xa/ya	-	-	S	-	-	-	-
350	M	Br	55,4	AB	LL	XY	PP	LYPB / LXPA	yo/xa	<10	-	-	-	S	-	-
352	M	Br	45,4	AB	LL	XY	PP	LYPB / LXPA	yo/xa	<10	-	-	-	S	-	-
354	M	Br	38,9	AD	HL	YY	PQ	HYPD / LYQA	yo/ya	-	-	-	-	-	-	S
371	M	Br	50,2	AA	HL	YY	PQ	LYQA / HYP A	ya/ya	-	-	-	S	-	-	-

NOTA: Br = branca; S = sim.

ANEXOS

ANEXO 1

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

- a) Por você ser doador de sangue está sendo convidado a participar de um estudo intitulado **“Avaliação do Polimorfismo Gênico da Lectina Ligante de Manose em Pacientes com Hepatite C Portadores de Fibrose Hepática Moderada ou Avançada e Associação com Resposta ao Tratamento”**. Auxiliando na formação de um grupo controle para contribuir no conhecimento da resposta imunológica ao vírus da hepatite C.
- b) O objetivo desta pesquisa é conhecer a associação entre uma proteína que participa da resposta imunológica às infecções, chamada lectina ligante de manose, e a evolução da Hepatite C e resposta ao tratamento com Interferon e Ribavirina.
- c) Os riscos que envolvem a sua participação no estudo são relacionados apenas a coleta de sangue e podem ser: sensação de desmaio, dor no local da punção, inflamação da veia e formação de hematoma.
- d) Contudo os benefícios esperados são contribuir para o melhor conhecimento da resposta Imunológica ao VHC.
- e) A médica Dr.^a Maria Lúcia Pedroso e a bioquímica Siumara Túlio (tel. 360-1800 ramal 6523) responsáveis por este estudo, estarão a disposição no telefone acima citado e farão os esclarecimentos que forem necessários, sempre seguindo o padrão Ético vigente no Brasil.
- f) Está garantido todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.
- g) A sua participação neste estudo é voluntária.
- h) Você tem a liberdade de recusar participar, ou se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.
- i) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto , se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.
- j) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são da responsabilidade do paciente.
- k) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no Hospital de Clínicas.
- l) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data (pelo(a) paciente): ____ / ____ / ____

Assinatura do(a) paciente: _____

Assinatura dos Pesquisadores:

Data (pelos pesquisadores): ____ / ____ / ____ ____ / ____ / ____

Nome dos pesquisadores: Maria Lúcia Pedroso Siumara Tulio

Versão de 19 de fevereiro de 2004.